

# **Peroxisomen in Zahngewebe**

Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde  
des Fachbereichs Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ingra Weßel  
aus Bochum

Gießen 2010

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie II  
des Fachbereiches 11 der Justus-Liebig-Universität Giessen  
Direktorin: Frau Prof. Dr. med. E. Baumgart-Vogt

Gutachter: Frau Prof. Dr. med. E. Baumgart-Vogt  
Gutachter: Herr Prof. Dr. M. Balkenhol  
Betreuer: Frau Prof. Dr. med. E. Baumgart-Vogt

Tag der Disputation: 16.09.2010

***Widmung***

Ich widme diese Arbeit meinen lieben Eltern

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>3</b>
<b>1. Präambel</b>	<b>7</b>
1.1. Abkürzungsverzeichnis	7
1.2. Vereinheitlichung der Nomenklatur der peroxisomalen Biogenese, den Peroxinen	10
1.3. Anmerkungen zu den Abbildungen	11
1.4. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	11
<b>2. Einleitung</b>	<b>13</b>
2.1. Peroxisomen	13
2.1.1. Biogenese von Peroxisomen	14
2.1.2. Peroxisomale Erkrankungen	18
2.2. Zahnentwicklung	19
2.2.1. Chronologie der Odontogenese im Mäuseembryo	20
2.2.2. Zahnleiste	20
2.2.3. Knospenstadium	21
2.2.4. Kappenstadium	21
2.2.5. frühes Glockenstadium	21
2.2.6. spätes Glockenstadium, Differenzierungsstadium	21
2.2.7. Sekretionsstadium	22
2.2.8. Entstehung der Zahnwurzel	22
2.3. Histologie der Zahngewebe	24
2.3.1. Amelogenese	25
2.3.2. Dentinogenese	29
2.4. Zielsetzung Arbeit	32
<b>3. Material und Methoden</b>	<b>34</b>
3.1. Versuchstiere, Geräte und Materialien	34
3.1.1. Versuchstiere	34
3.1.2. Laborgeräte	34
3.1.3. Verbrauchsmaterialien	35
3.1.4. Chemikalien	36
3.1.5. Verwendete Kits	37
3.1.6. Verwendete Primer	37
3.1.7. Verwendete Antikörper	38
3.2. Gewebefixierung und Einbettung	39
3.2.1. Fixantien und Puffer	39
3.2.2. Entnahme der Föten und Perfusionsfixierung	40
3.2.3. Perfusionsfixierung der neugeborenen und 1-3 Tage alten Tiere	41



3.2.4.	Perfusionsfixierung der adulten (3 Monate alten) Mäuse und Entkalkung der Gewebe	42
3.2.3.	Paraffineinbettung	42
3.2.5.	Paraffinschnitte	43
3.3.	Tiere für die Mikrodissektion	43
3.4.	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung	44
3.5.	Immunfärbungen	44
3.5.1.	Prinzip der Immunreaktion in Schnitten	44
3.5.2.	Immunhistochemischer Nachweis der peroxisomalen Proteine	45
3.5.3.	Entparaffinieren	45
3.5.4.	Antigenfreilegung und Antigenwiederherstellung	45
3.5.5.	Inhibition der enzymatischen Aktivität der Peroxidase	46
3.5.6.	Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen	46
3.5.7.	Erst-Antikörper	46
3.5.8.	Zweit-Antikörper	47
3.5.9.	ExtrAvidin-Meerrettich-Peroxidase	47
3.5.10.	Histochemischer Peroxidase-Nachweis	47
3.6.11.	Eindecken der Schnitte	47
3.6.	Immunfluoreszenz-Färbung	49
3.6.1.	Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten	49
3.6.2.	Antikörper-Einsatz	50
3.7.	Einschließen der Präparate	51
3.8.	Fluoreszenzmikroskopie	51
3.9.	„Laser-capture Microdissection“	53
3.9.	RNA-Isolierung	53
3.9.1.	Nachweis spezifischer mRNAs über RT-PCR	53
3.9.2.	Herstellung der cDNA	54
3.9.3.	RT-PCR	54
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
4.1.	Auswahl der Mausentwicklungsstadien für die Kopfpräparate und deren morphologischen Strukturerhaltung	56
4.1.1.	Morphologische Strukturerhaltung der Kopfpräparate	56
4.2.	Etablierung der Methode zum optimalen Peroxisomennachweis in Zahngeweben verschiedener Entwicklungsstadien	57
4.2.1.	Vorbehandlung und Antigenwiederherstellung an Paraffinschnitten	57
4.2.2.	Einsatz von NovaRed als Farbsubstrat für die Meerrettich-Peroxidase	57
4.2.3.	Immunfluoreszenz kombiniert mit Laserscanning-Mikroskopie führen zur hohen Sensitivität und optimaler Darstellung von Zellbestandteilen	59
4.3.	Nachweis der Peroxisomen in Zahngeweben der unterschiedlichen Entwicklungsstadien	60

4.3.1.	Peroxisomenvorkommen in verschiedenen Zahngeweben unterschiedlicher Entwicklungsstadien _____	60
4.3.2.	Unterschiede des Peroxisomenvorkommens in Abhängigkeit vom Zelldifferenzierungsstadium des gleichen Zahnes _____	67
4.3.3.	Verteilung der unterschiedlichen peroxisomalen Proteine abhängig von dem Maturierungsgrad der Ameloblasten und Odontoblasten _____	72
4.3.4.	Lokalisation von Peroxisomen im Vergleich zu Mitochondrien mittels Doppelimmunfluoreszenz in Zahngeweben _____	77
4.3.5.	Lokalisation von Peroxisomen entlang von Cytokeratinfilamenten _____	79
4.3.6.	Erste vergleichende Untersuchungen des peroxisomalen Kompartiments und der Veränderung der Zahngewebe in Pex11 $\beta$ -Knockout-Mäusen _____	82
4.4.	Mikrodissektion von Odontoblasten und Ameloblasten zum Nachweis spezifischer mRNA Expressionsmuster peroxisomaler Gene in beiden Zelltypen _____	85
<b>5.</b>	<b>Diskussion _____</b>	<b>87</b>
5.1.	Verschiedene Zahnstadien _____	87
5.2.	Methodische Aspekte zum Nachweis peroxisomaler Proteine oder entsprechender mRNAs in Zahngeweben _____	89
5.2.1.	Antigenwiederherstellung („Antigen-retrieval“) _____	89
5.2.2.	Antikörper-Spezifität und –sensitivität _____	90
5.2.3.	Methoden zum selektiven Nachweis von zellspezifischen mRNAs in Zahngeweben _____	91
5.3.	Studien aus der Literatur zu Peroxisomen im Zahngewebe _____	94
5.4.	Ausprägung des peroxisomalen Kompartiments in verschiedenen Zahngeweben _____	95
5.4.1.	Nachweis der Ubiquität der Peroxisomen im Zahngewebe über Antikörper gegen die Biogeneseproteine Pex13p und Pex14p in der Peroxisomenmembran _____	96
5.4.2.	Ausprägung des peroxisomalen Kompartiments in unterschiedlichen Zahn- und Zelldifferenzierungsstadien _____	97
5.4.3.	Relation der Peroxisomen zu Intermediärfilamenten in Zahngeweben _____	98
5.5.	Heterogenität verschiedener peroxisomaler Stoffwechselwege in unterschiedliche Zahngeweben _____	99
5.5.1.	Peroxisomale Katalase zum Schutz gegen oxidativen Stress in Zahngeweben _____	99
5.5.2.	Mögliche Funktion der Peroxisomen in der Synthese von Plasmalogenen, Cholesterin und polygesättigten Fettsäuren (PUFA) in Zahngeweben _____	101
5.5.3.	Kataboler peroxisomaler Lipidstoffwechsel – Regulation der Lipidhomöostase in Zahngeweben durch peroxisomale $\beta$ -Oxidation _____	103
5.5.4.	Mögliche weitere Funktionen der Peroxisomen im Ca <sup>2+</sup> -Haushalt der Zahngewebe _____	104
5.6.	Vergleich von Peroxisomen und Mitochondrien in Zahngeweben _____	105
5.7.	Erste Hinweise auf veränderte Zahngewebe in Knockout- Mäusen mit peroxisomalen Biogenesedefekt (Pex $\beta$ 11 $^{-/-}$ ) _____	106
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung _____</b>	<b>110</b>

<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>112</b>
<b>8.</b>	<b>Literatur</b>	<b>113</b>
<b>9.</b>	<b>Eigene Veröffentlichung</b>	<b>123</b>
<b>10.</b>	<b>Erklärung</b>	<b>124</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagungen</b>	<b>125</b>
<b>12.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>126</b>

## 1. Präambel

### 1.1. Abkürzungsverzeichnis

ABCD3	-	peroxisomales Membranprotein
AcoxI	-	Acyl-CoenzymA Oxidase I
A.dest.	-	destilliertes Wasser
ALDP	-	Adrenoleukodystrophie-Protein
ATP	-	Adenosin 5`-triphosphat
BMP	-	Morphogenetische Knochenproteine
Bp	-	Basenpaare
BSA	-	Rinderserumalbumin
Ca	-	Calcium
cDNA	-	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>7</sub>	-	Zitronensäure-Monohydrat
C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub>	-	Trinatriumcitrat-dihydrat
CHRS	-	cerebro-hepato-renale-Syndrom
CLSM	-	konfokale Laserscanning-Mikroskopie
CoA	-	Coenzym A
COX	-	Cyclooxygenase
cRNA	-	komplementäre Ribonukleinsäure
DAB	-	3,3`-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid
Dest.	-	destilliert
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DSPP	-	Dentinsialophosphoprotein
DTT	-	Dithiothreitol
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	-	epidermaler Wachstumsfaktor

EM	-	Elektronenmikroskopie
ER	-	endoplasmatisches Retikulum
Fgf	-	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
GH	-	Wachstumsfaktor
HCl	-	Salzsäure
H <sub>2</sub> O	-	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	Wasserstoffperoxid
HE	-	Hämatoxylin/Eosin-Färbung
HepG2	-	humane Hepatoblastomzelllinie
HO	-	Hemoxygenase
IF	-	indirekte Immunfluoreszenz
IGF	-	insulinähnlicher Wachstumsfaktor
IgG	-	Imunglobulin G
IHC	-	immunhistochemische Verfahren
IRD	-	infantile Refsum`sche Erkrankung
kDa	-	kilo-Dalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	Kaliumdihydrogenphosphat
Lsg	-	Lösung
MnSOD	-	mitochondrale superoxid Dismutase
mRNA	-	Boten-Ribonukleinsäure
NaCl	-	Natriumchlorid
NaHPO <sub>4</sub>	-	Natriumhydrogenphosphat
NALD	-	neonatale Adrenoleukodystrophie
NaOH	-	Natronlauge
NGF	-	Nervenwachstumsfaktor
NTB	-	Nukleosidtriphosphat

O <sub>2</sub>	-	Sauerstoff
OC	-	Osteocalcin
Oxphos	-	oxidative Phosphorylierung
PCK	-	Pancytokeratin
PCR	-	Polymerase Kettenreaktion
PBSA	-	2-Phenylbenzimidazol-5-sulfonsäure
PBS	-	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PBT	-	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung mit Blocking-Reagenz und Tween20
PEX( <i>x</i> )	-	Gen des Peroxin( <i>x</i> )
Pex( <i>x</i> )p	-	Peroxin( <i>x</i> )
PFA	-	Paraformaldehyd
PMP( <i>x</i> )	-	peroxisomales Membranprotein mit ( <i>x</i> ) kDa
PPAR	-	Peroxisomen-Proliferator aktivierter Rezeptor
PPRE	-	Peroxisomen-Proliferator-responsives Element
PTS	-	peroxisomale Targetingsequenz
PUFA	-	mehrfach ungesättigte Fettsäuren
RCDP	-	rhizomelische Chondrodysplasia punctata
RNA	-	Ribonukleinsäure
ROS	-	reaktive Sauerstoffspezies
rRNA	-	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	-	Reverse Transkriptase
SKL	-	Serin, Lysin, Leucin
Slit	-	Robo-Rezeptoren
SOD	-	Superoxid-Dismutase
snRNA	-	small nuclear-RNA

TBS	-	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEA	-	Triethylamin
TGF	-	transformierender Wachstumsfaktor
Tr	-	Tropfen
Tris	-	TRis-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	-	transfer Ribonukleinsäure
U	-	Unit
UV	-	Ultraviolett
V-CT	-	Volumen-Computer-Tomograph
Vol	-	Volumen
Wnt	-	Signalweg
ZNS	-	zentrales Nervensystem
ZS	-	Zellweger Syndrom
ZTL	-	Zentrales Tierlabor

### **1.2. Vereinheitlichung der Nomenklatur der peroxisomalen Biogenese, den Peroxinen**

Alle Gene, die an der Peroxisomenbiogenese beteiligt sind, werden nach den Richtlinien der 1996 eingeführten einheitlichen Nomenklatur als Peroxin-Gene (PEX#) bezeichnet (Distel et al 1996). Ihre Genprodukte sind die Peroxin-Proteine (Pex#p), die zu unterschiedlichen Proteinfamilien gehören, in unterschiedlichen Zellkompartimenten lokalisiert sind, jedoch alle funktionell in die Peroxisomenbiogenese eingeschaltet sind. Mittlerweile sind 32 PEX-Gene beschrieben worden. Die Nummerierung dieser Gene erfolgte nach der Erstbeschreibung (Heiland und Erdmann 2005). Pex1p wurde 1991 erstbeschrieben (Tsukamoto et al 1991). Darüber hinaus wurden die menschlichen PEX-Gene nach den Richtlinien des „HUGO Gene Nomenclature Committee“ (White et al 1997) benannt. Die Bezeichnung der Spezies wurde den Namen der Gene beziehungsweise der Proteine kursiv in lateinischen Buchstaben vorangestellt (z.B. *Hs*PEX11 $\beta$ ).

### **1.3. Anmerkung zu den Abbildungen**

Die Abbildungen der vorliegenden Arbeit wurden mit elektronischen Bildverarbeitungsprogrammen („Adobe Photoshop 8“, MsOffice 2003, PowerPoint 2003) bearbeitet.

Diese Abbildungen enthalten nur die Originaldaten und in keinem Fall wurde eine inhaltsverändernde Bildbearbeitung vorgenommen.

### **1.4. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen**

#### **Tabellen**

<b>Tabelle 1 :</b>	Bislang bekannte Peroxine
<b>Tabelle 2 :</b>	Chronologie der Odontogenese im Mausembryo
<b>Tabelle 3 :</b>	In der Tabelle sind alle in der Dissertation verwendeten Primer für die RT-PCR Analyse von mikrodisektierten Zahngewebe zusammengefasst.
<b>Tabelle 4 :</b>	Primärantikörper gegen peroxisomale Proteine und eingesetzte Verdünnungen
<b>Tabelle 5 :</b>	Kommerzielle Sekundärantikörper und eingesetzte Verdünnungen
<b>Tabelle 6 :</b>	Programmierung des Gewebeeinfiltrationsautomaten
<b>Tabelle 7 :</b>	Protokoll für die HE-Färbung
<b>Tabellen 8a und b :</b>	Protokoll für die Immunhistochemie mit der ABC-Peroxidase-Methode an Paraffinschnitten
<b>Tabelle 9 :</b>	Protokoll für die Immunfluoreszenz an Paraformaldehyd-fixierten Paraffinschnitten
<b>Tabelle 10 :</b>	Übersicht der Detektion verschiedener peroxisomalen Proteine in den unterschiedlichen Stadien der Zahnentwicklung
<b>Tabelle 11:</b>	Übersicht über peroxisomale Proteine abhängig von den Differenzierungsphasen der spezifischen Zellen in verschiedenen Zahngeweben des späten Glockenstadiums

#### **Abbildungen**

<b>Abb.1 :</b>	Biogenesmodell von Peroxisomen
<b>Abb.2 :</b>	Übersicht der Morphogenese der verschiedenen Zahnstadien beim menschlichen Schneidezahn.
<b>Abb.3 :</b>	Spitze einer Zahnanlage
<b>Abb.4 :</b>	Sekretorischer Ameloblast.
<b>Abb.5 :</b>	Differenzierungsphasen eines Ameloblasten.
<b>Abb.6 :</b>	Darstellung sekretorischer Odontoblasten.
<b>Abb.7 :</b>	Immunhistochemische Positivkontrollen von Peroxisomen in Leber und Speicheldrüsen.



- Abb.8 :** Doppelfluoreszenz für Maus-anti-Pancytokeratin (PCK26-Antikörper: Esel anti-Maus TexasRed Nachweis) und DAPI zur Kerngegenfärbung.
- Abb.9 :** Niedrige Übersichtsvergrößerungen der immunhistochemischen Lokalisation von Pex14p in Paraffinschnitten unterschiedlicher Entwicklungsstadien (E15.5-P90) des 2.Molaren.
- Abb.10:** Detailaufnahmen der immunhistochemischen Lokalisation von Pex14p in Paraffinschnitten unterschiedlicher Entwicklungsstadien des 2. Molaren.
- Abb.11:** Veranschaulichung der unterschiedlich starken Peroxisomen-Markierungen im Zahn des späten Glockenstadiums mittels Pex14p und Katalase.
- Abb.12:** Übersichtsaufnahmen von 2. Molaren einer 2 Tage alten Maus im Glockenstadium.
- Abb.13:** Höhere Vergrößerungen der einzelnen Entwicklungsphasen der Amelo- und Odontoblasten aus Abb.12.
- Abb.14:** Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Katalaseverteilung in Amelo- und Odontoblasten verschiedener Differenzierungsphasen (Phase1-3) eines 2.Molaren der Maus.
- Abb.15:** CLSM-Aufnahmen eines Doppelimmunfluoreszenzpräparates (Pex14p und ABCD3).
- Abb.16:** Verteilung der unterschiedlichen peroxisomalen Proteine in höheren Vergrößerungen der hartsubstanzbildenden Zellen des 2.Molaren der Maus im späten Glockenstadium.
- Abb.17:** CLSM-Aufnahmen der peroxisomalen Proteien der Zahnabschnitte aus den verschiedenen Präparaten mit Zellen in der Sekretionsphase (Phase3).
- Abb.18:** Verteilung von Peroxisomen und Mitochondrien in verschiedenen Phasen der Amelo- und Odontoblastenmaturierung durch Doppelimmunfluoreszenz für Pex14p und KomplexIII der Atmungskette.
- Abb.19:** Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Doppellokalisierung für Pex14p und verschiedene Intermediärfilamente.
- Abb.20:** CLSM- Übersichtsaufnahmen von Doppellokalisierung für Pex14p und verschiedene Intermediärfilamente.
- Abb.21:** Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme in DAPI-Färbung zum Vergleich des Entwicklungszustandes der Zähne zwischen neugeborenen heterozygoten Mäusen(+/-) und Pex11 $\beta$ KO-Mäusen (-/-).
- Abb.22:** Immunfluoreszenz zur Lokalisation von Pex14p in Wildtyp-Mäusen, heterozygoten Tieren, und Pex11 $\beta$ -Knockout Mäusen.
- Abb.23:** Mikrodissektion und spezifische RT-PCR-Reaktionen für mRNAs von Ameloblasten und Odontoblasten.

## 2. Einleitung

### 2.1. Peroxisomen

Peroxisomen, früher Mikrobodies genannt, sind kleine Zellorganellen, deren Bedeutung lange Zeit unbekannt war. Mitte der 50er Jahre hat Rhodin sie mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in der Niere entdeckt, doch ihre Funktion war unklar (Fahimi 1969; Rhodin 1955). In den 60ern hat der belgische Biochemiker De Duve den Namen „Peroxisom“ für diese Organellen vorgeschlagen, weil der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Stoffwechsel das einzige gemeinsame funktionelle Merkmal der in den Peroxisomen vorkommenden Enzyme war (De Duve 1965; De Duve und Baudhuin 1966). Da die Mikrobodies kein Elektronentransportsystem zur Energiegewinnung besitzen, wird der Sauerstoff über deren Oxidasen zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reduziert, was jedoch für die Zellen schädlich ist. Deshalb enthalten die Peroxisomen auch Katalase, welche  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$  abbaut (Fahimi 1969; Kleinig und Sitte 1992; Lazarow 1987; Lazarow und Fujiki 1985).

Dariusz Fahimi entwickelte Ende der 60er Jahre eine Methode, um die Katalase in den Peroxisomen anhand ihrer peroxidatischen Reaktion mittels Licht- und Elektronenmikroskopie mit Hilfe von 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) im alkalischen Milieu nachzuweisen (Fahimi 1969; Fahimi und Baumgart 1999).

Peroxisomen in Hepatozyten der Leber sind 0,2-0,5  $\mu\text{m}$  im Durchmesser und werden nur von einer einfachen Membran umschlossen. Sie kommen ubiquitär in eukaryontischen Zellen vor und haben oft ein kugelförmiges Aussehen. Allerdings gibt es auch Zellen, in denen diese Organellen schlauchförmig ausgeprägt sind (Fahimi und Baumgart 1999). Peroxisomen haben vielseitige Funktionen im Intermediär-Stoffwechsel, abhängig von der Funktion der entsprechenden Zelltypen. Deshalb kann ihre Anzahl abhängig von Gewebeart und Funktion der Zelle auch variieren und beträgt in der Regel einige hundert pro Zelle. Durch die große Variabilität in Anzahl, Größe, Form und Proteinausstattung, sowie der Fähigkeit zur raschen Proliferation nehmen die Peroxisomen eine Sonderstellung unter den Zellorganellen ein. Jeder Körperzelle wird somit eine effiziente Anpassung an die herrschenden Stoffwechselbedingungen ermöglicht (Thoms und Erdmann 2005). Die Anzahl der Peroxisomen wird vermutlich Metabolismus-abhängig gesteuert (Chang et al 1999).

Elektronenmikroskopisch kann man eine feingranuläre Matrix in den Peroxisomen erkennen. Teilweise sind dort auch verschiedene kristalline Einschlüsse enthalten, z.B. Cores mit Urat-Oxidase oder Marginalplatten mit  $\alpha$ -Hydroxysäureoxidase B (Fahimi 1974). Man weiß mittlerweile, dass die kleinen Organellen noch weitere Enzyme haben als nur die des

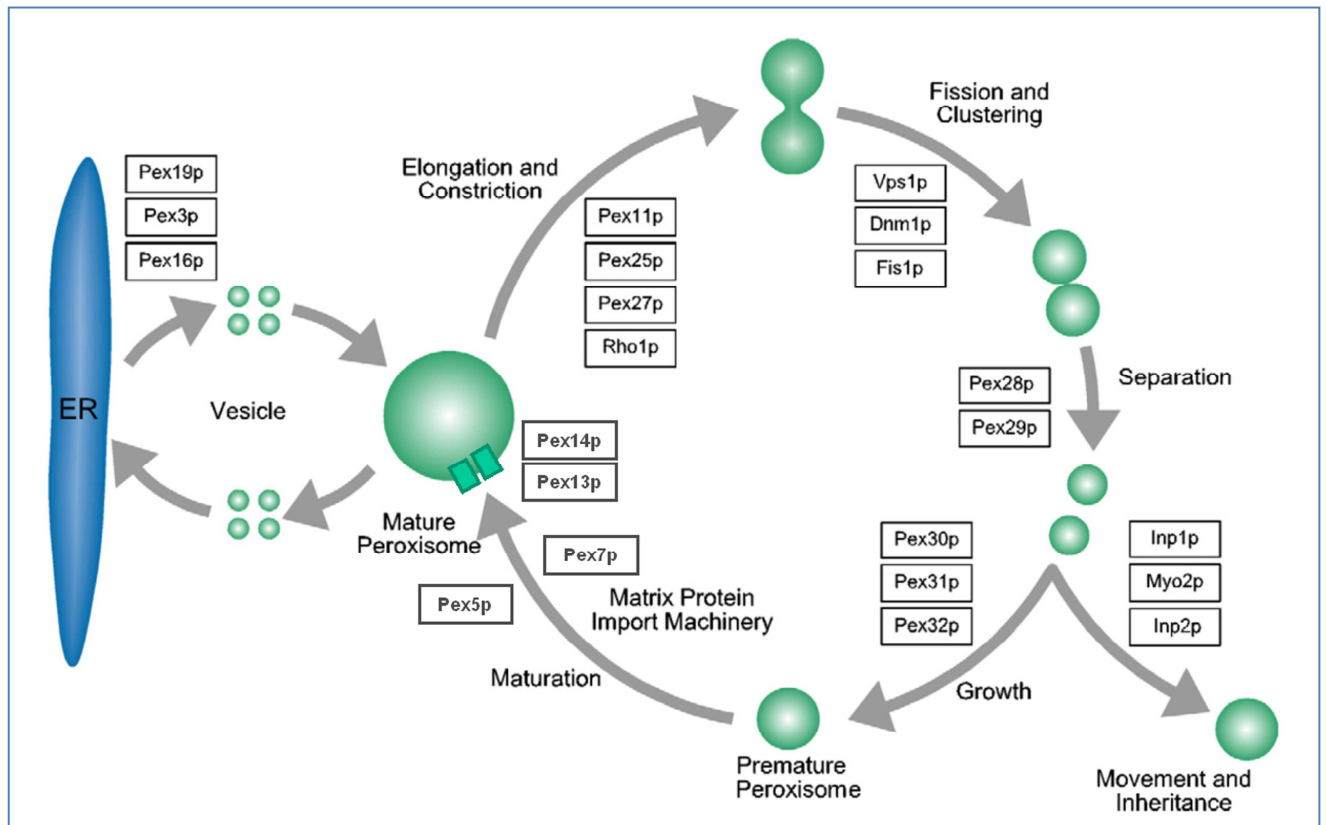
Wasserstoffperoxidstoffwechsels. Dazu zählen Enzyme der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Oxidation von langkettigen Fettsäuren und Enzyme für die Biosynthese von Cholesterin, Gallensäuren und Etherlipiden (Islinger et al 2006; Li und Gould 2002). Insgesamt sind mehr als 130 verschiedene Enzyme in Hepatozytenperoxisomen nachgewiesen worden (Islinger et al 2007). Die Ausstattung der Peroxisomen mit den Enzymen ist von Gewebe zu Gewebe unterschiedlich. In einem bestimmten Gewebe kommen niemals Peroxisomen mit gleicher Proteinausstattung oder alle peroxisomalen Enzyme in relativ gleicher Menge vor. Die Ausstattung mit den unterschiedlichen Enzymen ist oft vom Differenzierungsgrad der Zellen abhängig, sowie von der Versorgung mit Substraten (Kleinig und Sitte 1992).

Die Peroxisomen sind sehr zahlreich in der Leber (Hepatozyten) und der Niere (proximale Tubuli) vorhanden (Fahimi und Baumgart 1999). Microbodies wurden bisher nur durch elektronenmikroskopischen Aufnahmen in Odontoblasten beschrieben (Provenza 1988), über deren Funktion und der Ausprägung dieses Zellkompartiments in Zahngeweben ist nichts bekannt.

### **2.1.1. Biogenese von Peroxisomen**

Obwohl Peroxisomen bereits 1954 entdeckt wurden, ist deren Herkunft und Biogenese noch nicht völlig aufgeklärt (Platta und Erdmann 2007). Peroxisomen enthalten im Gegensatz zu den Mitochondrien keine eigene Erbinformation (South et al 2001). Anfangs dachte man, dass sich die gesamten Peroxisomen vom endoplasmatischen Retikulum abknospen. Studien bewiesen aber, dass alle peroxisomalen Membran- und Matrixproteine von nuklearen Genen kodiert werden, an freien Polyribosomen im Cytosol synthetisiert und anschließend posttranslational in existierende peroxisomale Membranen importiert werden (Lazarow und Fujiki 1985). Mit Hilfe der Elektronenmikroskopie wurde nachgewiesen, dass die Membranstrukturen, die man für Teile des ER gehalten hat, peroxisomale Proteine enthielten und Teile katalase-negativer Membrananhänge waren (Fahimi und Baumgart 1999). Zurzeit wird ein Modell der peroxisomalen Biogenese diskutiert, dass sowohl die Entstehung von Peroxisomen durch Teilung bestehender Peroxisomen als auch die Möglichkeit einer Entstehung von Peroxisomen aus nicht peroxisomalen Membranstrukturen unbekannten Ursprungs vereint. Kontrovers diskutiert wird weiterhin die Beteiligung des ER an der peroxisomalen Biosynthese (Platta und Erdmann 2007).

Nur drei der 32 bisher identifizierten Peroxine – Pex3p, Pex16p und Pex19p – scheinen im peroxisomalen Membranprotein-Import eine Rolle zu spielen (Heiland und Erdmann 2005).



**Abb.1: Biogenesemodell von Peroxisomen.** Die Darstellung beruht auf einem Modell von Platta & Erdmann (2007) und gibt eine Übersicht über die Entstehung, Teilung und Fusion der Peroxisomen. Pex3p, Pex16p und Pex19p sind erforderlich für die Entstehung der peroxisomalen Membran und ermöglichen den Import der peroxisomalen Membranproteine. Es wird diskutiert, dass diese Proteine für die Neuentstehung von peroxisomalen Vorstufen aus dem ER zuständig seien. Die Entstehung von reifen Peroxisomen bedarf der Verschmelzung dieser Vorläufervesikel mit bereits vorhandenen Organellen. Die peroxisomalen Membranproteine Pex11p, Pex25p und Pex27p sind vermutlich in die Elongierung und Abschnürung von Peroxisomen involviert (Teilung der Organellen). Der Reifungsprozess der Peroxisomen wird durch anschließenden Matrixproteinimport über die cytoplasmatischen „shuttle“-Rezeptoren Pex5p und Pex7p und deren Andocken an Pex13p und Pex14p in der Peroxisomenmembran mit nachfolgender Abgabe der Matrixproteine mit peroxisomalen Zielerkennungssequenzen und deren Translokation in die Matrix ermöglicht.

Wie die peroxisomalen Membranproteine werden auch die peroxisomalen Matrixproteine an freien Ribosomen im Cytosol synthetisiert und posttranslational ins Peroxisom importiert (Lazarow und Fujiki 1985).

Vom Cytoplasma aus werden die Enzyme direkt ins Lumen der Organellen transportiert (Kleinig und Sitte 1992). Für den Transport in die Peroxisomen haben die Enzyme spezifisch peroxisomale Signalsequenzen. Diese Sequenzen werden im Cytoplasma an spezifische

Rezeptoren (Pex5p und Pex7p) gebunden und von diesen Rezeptoren zur Peroxisomenmembran gebracht, wo sie durch einen Translationskomplex aus Peroxinen in die Matrix eingeschleust werden. Zwei von den Signalsequenzen für peroxisomale Matrixproteine sind bekannt: PTS1 und PTS2. PTS steht hierbei für peroxisomale „targeting“ Signale, wobei das erste aus einer C-terminalen Sequenz von 3 Aminosäuren mit der Konsensussequenz (S,C,A) -(K,R,H)-(L,M) besteht (Swinkels et al 1992), welche von Pex5p erkannt wird (McCollum et al 1993). Das weniger konservierte peroxisomale Targeting Signal 2 mit der Consensussequenz (R,K)-(L,V,I)-X5-(H,Q)-(L,A) ist bisher nur für sehr wenige peroxisomale Matrixproteine beschrieben worden. PTS2-Proteine werden über Pex7p zu dem Docking-Komplex der peroxisomalen Membran transportiert (Marzioch et al 1994). Im Gegensatz zu Mitochondrien können Peroxisomen sogar noch sehr große gefaltete Proteine (bzw. Proteinkomplexe) einschleusen. Man diskutiert, dass diese Proteine durch regulierbare Translokationsporen in die kleinen Zellorganellen gelangen (Fahimi und Baumgart 1999).

Wie bereits in der Präambel vorgestellt, werden essentielle Proteine für die peroxisomale Biogenese als „Peroxine“ und deren zugehörige Gene als PEX-Gene bezeichnet. 32 verschiedene Peroxine (Pex1p-32p), die an der Biogenese der Peroxisomen beteiligt sind, sind bislang identifiziert worden. Die genauen Funktionen der unterschiedlichen Peroxine sind noch nicht vollständig geklärt. Eine Übersicht über die beim Menschen und anderen Organismen bekannten Peroxine gibt Tabelle 1.

**Tabelle 1: Bislang bekannte Peroxine**

Peroxin	Organismus	Vermutete Funktion	Eigenschaften des Proteins
Pex1	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Matrixproteinimport, Vesikelfusion	AAA-ATPase, MAP/cytosolisch
Pex2	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Matrixproteinimport, PTS-Rezeptor Recycling	IMP
Pex3	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Membranbiogenese	IMP
Pex4	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Ubiquitin-Konjugation	MAP/cytosolisch
Pex5	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	PTS1-Rezeptor	MAP/cytosolisch
Pex6	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Matrixproteinimport, Vesikelfusion	MAP/cytosolisch
Pex7	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	PTS2-Rezeptor	MAP/cytosolisch
Pex8	Hefen	Matrixproteinimport	MAP
Pex9	<i>Yl</i>	Matrixproteinimport, Wachstum des Peroxisoms	IMP
Pex10	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Matrixproteinimport, PTS-Rezeptor Recycling	IMP
Pex11	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Proliferation	IMP
Pex12	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Matrixproteinimport, PTS-Rezeptor Recycling	IMP
Pex13	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Matrixproteinimport, PTS-Rezeptor Docking und Recycling	IMP
Pex14	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Matrixproteinimport, PTS-Rezeptor Docking	IMP
Pex15	<i>Sc</i>	Reversibles "Targeting" von PEX6	IMP
Pex16	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Membranbiogenese, PMP "Targeting" und/oder Import	IMP/MAP
Pex17	Hefen, Pflanzen	Matrixproteinimport, PTS-Rezeptor Docking	IMP
Pex18	<i>Sc</i>	PTS2-abhängiger Matrixproteinimport	MAP/cytosolisch
Pex19	<i>Hs</i> , Hefen, Säuger, Pflanzen	Membranbiogenese, PMP "Targeting" und Import	MAP/cytosolisch
Pex20	<i>Yl</i> , <i>Nc</i>	PTS2-abhängiger Matrixproteinimport	MAP
Pex21	<i>Sc</i>	PTS2-abhängiger Matrixproteinimport	MAP/cytosolisch
Pex22	Hefen	Membranbindung/ "Targeting" von Pex4	IMP
Pex23	<i>Yi</i> , <i>Nc</i>	Matrixproteinimport, Proliferation	IMP
Pex24	<i>Yl</i> , <i>Nc</i>	Matrixproteinimport, PMP "Targeting" und Import. Proliferation	IMP
Pex25	<i>Sc</i>	Proliferation	MAP
Pex26	<i>Hs</i> , Säuger	Matrixproteinimport	PMP
Pex27	<i>Sc</i>	Proliferation	MAP
Pex28	<i>Sc</i>	Dynamik von Peroxisomen, Proliferation	IMP
Pex29	<i>Sc</i>	Dynamik von Peroxisomen, Proliferation	IMP
Pex30	<i>Sc</i>	Dynamik von Peroxisomen, Proliferation	IMP
Pex31	<i>Sc</i>	Dynamik von Peroxisomen, Proliferation	IMP
Pex32	<i>Sc</i>	Dynamik von Peroxisomen, Proliferation	IMP

*Hs* = *Homo sapiens*, *Sc* = *Saccharomyces cerevisiae*, *Yl* = *Yarrowia lipolytica*, *Nc* = *Neurospora crassa*, AAA-ATPase = „ATPases associated with diverse cellular activities“, PMP = peroxisomales Membranprotein, MAP = Membran assoziiertes Protein, IMP = integrales Membranprotein. Diese Tabelle ist eine Auflistung bislang identifizierter Peroxine. Die Quellen hierzu stammen von Platta und Erdmann (2007) und aus der Dissertation von Andreas Schemenewitz aus Bochum (Schemenewitz 2003).

### 2.1.2. Peroxisomale Erkrankungen

Krankheiten, die auf Funktionsstörungen der Peroxisomen zurückgehen, kann man in zwei Gruppen einteilen. Zum einen sind es die peroxisomalen Biogenesestörungen, zum anderen sind es peroxisomale Einzelenzymdefekte (Fahimi und Baumgart 1999; Shimozawa 2007).

Die Erkrankungen, die aufgrund der peroxisomalen Biogenesestörungen (PBD) entstehen, sind diejenigen mit der schwerwiegendsten Verlaufsform. Es handelt sich um angeborene, autosomal-rezessiv vererbte Erkrankungen, welche mit massiven Stoffwechselstörungen sowie Fehlbildungen und Entwicklungsstörungen einhergehen und unweigerlich zum Tod der Patienten führen. In Organbiopsien oder Fibroblastenkulturen dieser Patienten sind nur rudimentäre Peroxisomen „ghosts“ oder keinerlei Reststrukturen nachzuweisen. CHRS, das cerebro-hepato-renale Syndrom, oder auch Zellweger-Syndrom genannt, ist die schwerste Verlaufsform der peroxisomalen Biogeneseerkrankungen. Kinder mit Zellweger-Syndrom sterben oft innerhalb der ersten Lebensmonate, weil diverse Multiorgan-Defekte vorliegen. Merkmale dieser Krankheit sind Ossifikationsstörungen des Schädels mit offenen Fontanellen, herabgesetzte Muskelspannung (genereller Hypotonus), Entwicklungsstörungen im Gehirn, Blindheit, Taubheit, Leberzirrhose mit chronischer Gelbsucht und angeborene Nierenzysten. Die neonatale Adrenoleukodystrophie (NALD) und die infantile Refsumsche Erkrankung (Infantile Refsumsches Disease=IRD) sind mildere Verlaufsformen der peroxisomalen Biogeneseerkrankungen mit ZS-ähnlichem klinischen Phänotyp. Die rhizomelische Chondrodysplasia punctata (RCDP) ist eine weitere peroxisomale Biogeneseerkrankung, bei der jedoch nur ein teilweiser Importdefekt der PTS2-Proteine vorliegt (Sacksteder und Gould 2000; Wanders et al 1984; Wanders et al 1985). Für alle erwähnten Erkrankungen gibt es bisher keine Therapie. Eventuell soll zukünftig eine Gentherapie in Erwägung gezogen werden.

Peroxisomale Einzelenzymdefekte haben einen isolierten Ausfall der entsprechenden Stoffwechselfunktion zur Folge. In Organbiopsien oder Fibroblastenkulturen dieser Patienten sind jedoch die Peroxisomen strukturell intakt und bis auf den Einzelenzymdefekt normal leistungsfähig. Der am besten charakterisierte peroxisomale Einzeldefekt ist die x-chromosomale vererbte Adreno-Leukodystrophie (X-ALD). Bei dieser Erkrankung ist der Fettstoffwechsel gestört, weil ein Lipid-Transporterprotein in der Peroxisomenmembran mutiert ist. Das Adrenoleukodystrophie-Protein (ALDP), heute ABCD1Gen genannt, sorgt dafür, dass langkettige Fettsäuren in die Matrix der Peroxisomen transportiert und dort durch

die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation abgebaut werden können. Wenn der Transport in diese Organelle defekt ist, lagern sich die langkettigen Fettsäuren im Cytoplasma und in der Plasmamembran von Zellen mit ausgeprägtem Lipidstoffwechsel, z.B. der Nebennierenrinde, und im Gehirn ab. Im Gehirn werden dadurch die Myelinscheiden geschädigt und es kommt durch Entzündungsvorgänge zur Demyelinisierung, die die Nerven mit daraus resultierender Ausbildung von Lähmungserscheinungen bei den Patienten zerstört. Die Erkrankung kann -je nach Ausprägungsgrad- vom Säuglings- bis ins Erwachsenenalter auftreten. Auch die Refsum'sche Erkrankung, welche auf einem Defekt der Phytanoyl-CoA Hydroxylase, einem Protein des Phytansäurestoffwechsels ( $\alpha$ -Oxidation), beruht, gehört zu der Gruppe der Einzelenzymdefekte. Auch Einzelenzymdefekte peroxisomaler  $\beta$ -Oxidationsenzyme führen zu schweren angeborenen Stoffwechselerkrankungen, die bisher nicht therapiert werden können und unweigerlich zum Tod führen (Gärtner 2000) (früher bezeichnet als Pseudo-NALD oder Pseudo-Zellweger-Syndrom).

Um Therapiekonzepte zur Heilung dieser Krankheiten zu entwickeln werden Knockout-Mauslinien als Tiermodelle etabliert, bei denen das entsprechende Gen mutiert ist oder fehlt. An diesen Mäusen kann man anschließend molekulare Pathogenese dieser Erkrankungen erforschen, besser verstehen, Therapiekonzepte entwickeln und ausprobieren und eventuell somit die Überlebenschancen der Menschen erhöhen. Mausmodelle wurden bereits für verschiedene PEX-Gene, PEX5 (Baes et al 1997), PEX2 (Faust und Hatten 1997), PEX13 (Maxwell et al 2003), PEX11 $\alpha$  und PEX11 $\beta$  (Li et al 2002; Li und Gould 2002),  $\beta$ -Oxidationsenzyme: ACOX1 (Fan et al 1996), MFP1 (Reddy 2004), MFP2 (Martens et al 2008) und SCPX (Seedorf et al 2000) entwickelt, die einen ähnlichen Phänotyp wie beim Menschen aufweisen. In dieser Dissertation wurde das Pex11 $\beta$ -Mausmodell dazu verwendet um Veränderungen in der Zahnentwicklung zu analysieren (siehe Kapitel 4.3.7).

## **2.2. Zahnentwicklung**

Die Odontogenese ist ein sehr komplizierter embryologischer Prozess. Die Zahnentwicklung beginnt mit einer Reihe von ektodermal-mesenchymalen Interaktionen, die dem Zahn zu seiner Differenzierung und Morphologie verhelfen. Dabei spielen auch reziproke Zell- und Zellmatrixinteraktionen eine Rolle (Linde und Goldberg 1993; Otsuji et al 1999). Der exakte Weg der molekularen Mechanismen während der Zahnentwicklung ist zurzeit noch nicht völlig aufgeklärt. Molekulare Interaktionen zwischen Epithel und Mesenchym mit entsprechenden Rezeptoren und Signalkaskaden, extrazellulären Matrixmolekülen, Wachstumsfaktoren, z.B. BMP4, Fgfs und TGFs wurden bereits beschrieben. Die



extrazelluläre Matrix und verschiedene Wachstumsfaktoren scheinen eine sehr wichtige Rolle bei der Zahnentwicklung zu spielen (Fleischmannova 2008; Slavkin et al 1976; Thesleff und Aberg 1999; Thesleff und Nieminen 1996).

Am Anfang der Zahnentwicklung bildet sich eine kleine leistenartige Verdickung im oralen Epithel (Zahnleiste), die sich in der weiteren Zahnmorphogenese an verschiedenen Stellen zur Zahnknospe, -kappe und -glocke weiterentwickelt (Domingues et al 2000; Fleischmannova 2008). Die Induktion und Differenzierung in der Kappenmorphogenese wird durch Komplexe molekulare Mechanismen von Signalzentren, den primären und sekundären Schmelzknoten ausgelöst (Fleischmannova 2008).

### 2.2.1. Chronologie der Odontogenese im Mäuseembryo

Eine Übersicht der verschiedenen Zahnstadien bei Mäusen gibt die folgende Tabelle:

**Tabelle 2: Chronologie der Odontogenese im Mausembryo**

Die Ziffern entsprechen dem jeweiligen Embryonaltag

	Schneidezähne		1.Molar		2.Molar		3.Molar	
	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior	inferior	superior
Zahnleiste	12,5.-13.		11.-13.					
Knospenstadium	13.-14.		13.-14.		16.-18.	17.-18.	18.-23.	
Kappen/Glockenstadium	14.-16,5.		14.-18.	14.-19.	18.-20.	18.-21.		
Odontoblasten	16,5.-17.	17.-18.	18.-19.	19.-20.	20.-21.	21.-22.		
Ameloblasten	17.-18.	18.-19.	19.-20.	20.-21.	21.-22.	22.-23.		
Prädentin	17.-18.	18.-19.	19.-20.	20.-21.	21.-22.	22.-23.		
Schmelz	18.-23.	19.-23.	20.-23.	21.-23.	22.-23.	23.		
Dentin	18.-23.	19.-23.	20.-23.	21.-23.	22.-23.	23.		

Nach Ruch, 1987, Universidad del Pais Vasco, Bilbao, Spanien (Schroll 2004)

### 2.2.2. Zahnleiste

Zu Beginn der Mause Zahnentwicklung, am 10. und 11. Embryonaltag entwickeln sich im Mundhöhlenepithel zwei Leisten (MacKenzie et al 1992): die vestibuläre Leiste, aus der sich das Vestibulum formt, und die orale Leiste, die sich zu der Zahnleiste weiterentwickelt.

Letztere entsteht durch Proliferation der basalen Zellen des oralen Ektoderms in das darunter liegende Mesenchym (Provenza 1988). Studien haben gezeigt, dass die Zellen des anliegenden Mesenchyms aus der Neuralleiste stammen (Thesleff und Sharpe 1997) und Wachstumsfaktoren zur Differenzierung des Schmelzepithels sezernieren (Fleischmannova 2008).

### **2.2.3. Knospenstadium**

Durch die immer weiter proliferierenden Epithelzellen entstehen Zahnknospen, die vom mesenchymalen Gewebe umschlossen sind (Fleischmannova 2008; Thesleff et al 1979). Die Differenzierung der Zahnknospen findet zwischen dem 11. bis zum 13. Embryonaltag statt (Keranen et al 1998). Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die Morphogenese der verschiedenen Zahnstadien.

### **2.2.4. Kappenstadium**

Zwischen dem 13. und 15. Embryonaltag wird die tiefe Oberfläche jeder Zahnknospe vom Mesenchym eingestülpt und erhält dadurch ein kappenartiges Erscheinungsbild. Ihr ektodermaler Teil wird als Schmelzorgan bezeichnet, weil es später den Schmelz bilden wird. Der eingestülpte Teil, der mit Mesenchym ausgefüllt ist, wird als Zahnpapille bezeichnet. Sie ist die Anlage der Zahnpulpa. Die Zahnanlage wird von einem Zahnsäckchen umgeben, welches aus mesenchymalen Zellen besteht und von dem Zahnepithel induziert wurde. Es gibt ein äußeres und ein inneres Schmelzepithel. Dazwischen liegen retikuläre Epithelzellen, die Schmelzpulpa (Jernvall et al 1994). Am 14. Embryonaltag lässt sich der primäre Schmelzknoten histologisch nachweisen (Keranen et al 1998), der induzierende Faktoren für das benachbarte Mesenchym abgibt (Fleischmannova 2008).

### **2.2.5. Frühes Glockenstadium**

Zwischen dem 15. und 17. Embryonaltag nimmt die Zahnanlage durch die labiale Eindellung eine glockenförmige Gestalt an. Das Mesenchym liegt nun als Zapfen unterhalb vom inneren Schmelzepithel. Zwischen diesem und der Schmelzpulpa entsteht das Stratum intermedium. Die sekundären Schmelzknoten sind am 16. Embryonaltag nachweisbar (Jernvall et al 1994; Keranen et al 1998) und exprimieren Slit1, Wnt10a und FGF8 im Epithel in den sekundären Schmelzknoten.

### **2.2.6. Spätes Glockenstadium, Differenzierungsstadium**

Die Zellen des inneren Schmelzepithels differenzieren sich ab dem 17. Embryonaltag zu Ameloblasten (Keranen et al 1998; Provenza 1988). Unter ihrem Einfluß (TGFs) entstehen aus den, an dem inneren Schmelzepithel anliegenden, Zellen der Zahnpulpa die Odontoblasten (Fleischmannova 2008; Welsch 2003). Ameloblasten und Odontoblasten sind beides Zelltypen, die unterschiedliche Zahnhartsubstanzen bilden (Schmelz und Dentin=Enamel und Dentinum). Die Odontoblasten fangen an Prädentin zu sezernieren, welches sich durch Einlagerung von Kalk zu Dentin umwandelt und die Zahnpulpa

zunehmend einengt. Nach der Dentinentstehung werden die Ameloblasten angeregt die ersten Schmelzprismen abzuscheiden (Keith 1996). Die Ameloblasten halten über die Tomesschen Fortsätze Kontakt zum Zahnschmelz (Provenza 1988).

#### **2.2.7. Sekretionsstadium**

Zum Zeitpunkt der Geburt, ca. der 21.Tag der Embryonalentwicklung, befinden sich beide Zelltypen in der Sekretionsphase. Die Zellen des äußeren Schmelzepithels werden squamös und kappenförmig. Die meisten Zellen des retikulären Gewebes der Schmelzpulpa kollabieren und verschwinden. Von den Ameloblasten werden Schmelzprismen abgeschieden, die sich zu unstrukturierten Kristallen entwickeln. Blutgefäße entwickeln sich im umliegenden Bindegewebe und bringen die Nährstoffe zu den Ameloblasten, so dass diese ihre maximale Größe erreichen. Die Zellorganellen nehmen zu und wandern zu den Zellpolen. Der Zellkern orientiert sich im proximalen Drittel der Zelle. Der Golgi-Apparat und das endoplasmatische Retikulum sind eher in der Mitte lokalisiert. Das distale Ende der Ameloblasten ist gefüllt mit rauem ER und Sekretionsvesikel. Mitochondrien sind über den gesamten Zellkörper verteilt. Die Schmelzprismen beginnen sich direkt nach der Dentinogenese zu formieren. Man kann die Schmelzbildung auch in 3 Phasen einteilen: 1) anfangs entsteht der Tomessche Fortsatz, 2) anschließend formen sich die Schmelzprismen, 3) zum Schluss erfolgt die Mineralisierung der Schmelzprismen (Provenza 1988).

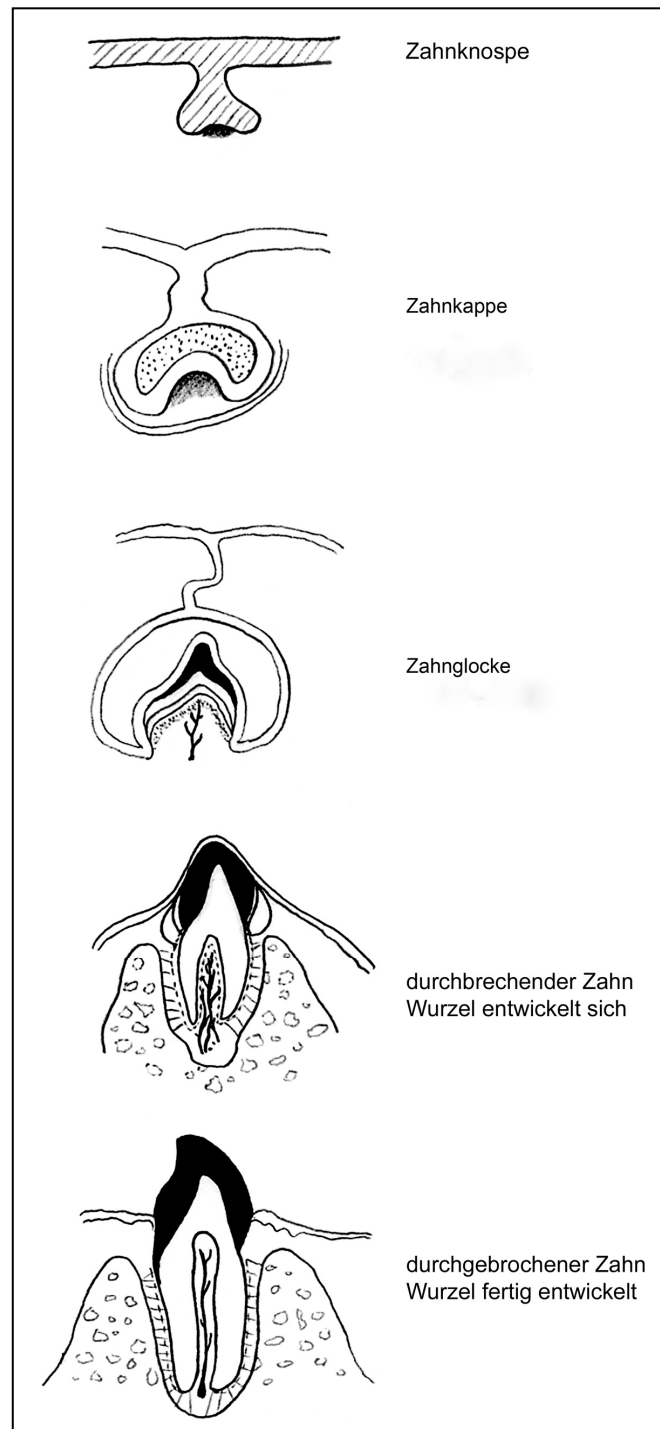
Die Anzahl der Organellen der Präodontoblasten nehmen ebenfalls zu. Die Zellen werden länger, differenzieren sich zu sekretorischen Odontoblasten und produzieren das Primärdentin (Couve 1986). Die Mineralisierung des Dentins beginnt noch vor der Entstehung des Zahnschmelzes. Im Laufe der Dentinbildung ziehen sich die Odontoblasten in Richtung Pulpa zurück. Sie bilden dabei jeweils einen Odontoblastenfortsatz aus, die in der Gesamtheit als Tomessche Fasern bezeichnet werden. Mit diesen Fortsätzen bleiben die Odontoblasten mit der ehemaligen Basalmembran in Verbindung (Welsch 2003).

#### **2.2.8. Entstehung der Zahnwurzel**

Nach der Bildung der Zahnkrone vereinigen sich das innere und äußere Schmelzepithel und wachsen zusammen in die Tiefe. Zusammen bilden sie die Hertwigsche Epithelscheide des Zahnes. Sie induziert die Bildung des Wurzeldentins. Nach der Geburt lösen sich die Zellen der epithelialen Wurzelscheide auf und aus dem anliegenden Zahnsäckchen differenzieren sich Zementoblasten. Sie umgeben das Wurzeldentin mit Zement. Des Weiteren differenzieren sich aus dem Zahnsäckchen das Periodontium und der angrenzende

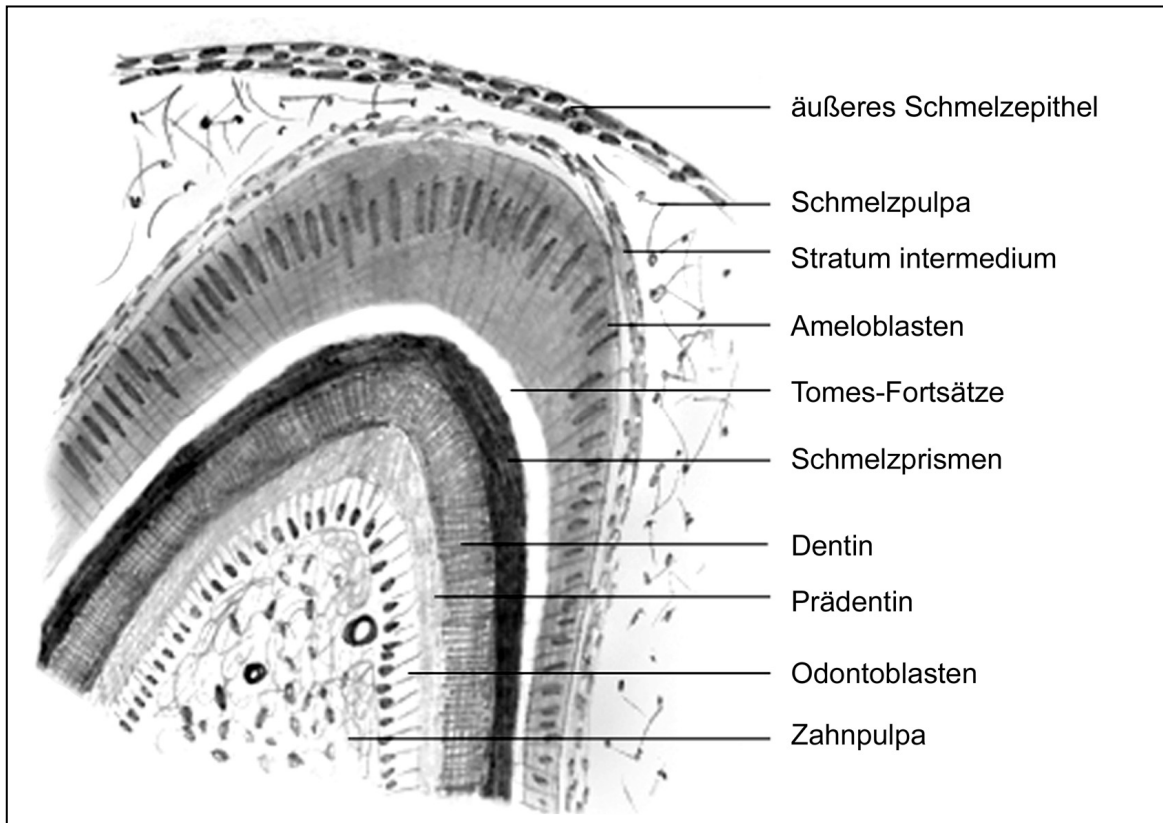
Alveolarknochen. Durch die Bildung von Zement wird die Pulpahöhle verkleinert (Provenza 1988; Welsch 2003; Zeichner-David et al 2003).

In der nachfolgenden Zeichnung (Abb.2) sind alle beschriebenen Zahnstadien in einer Übersicht zusammengestellt.



**Abb.2: Übersicht der Morphogenese der verschiedenen Zahnstadien beim menschlichen Schneidezahn.** Das orale Epithel verdickt sich, senkt sich ein als Zahnleiste und entwickelt eine Zahnknospe. Anschließend folgen das Kappen- und Glockenstadium und der fertig entwickelte Zahn. (Eigene Zeichnung; modifiziert nach Keith (Keith 1996)).

### 2.3. Histologie der Zahngewebe

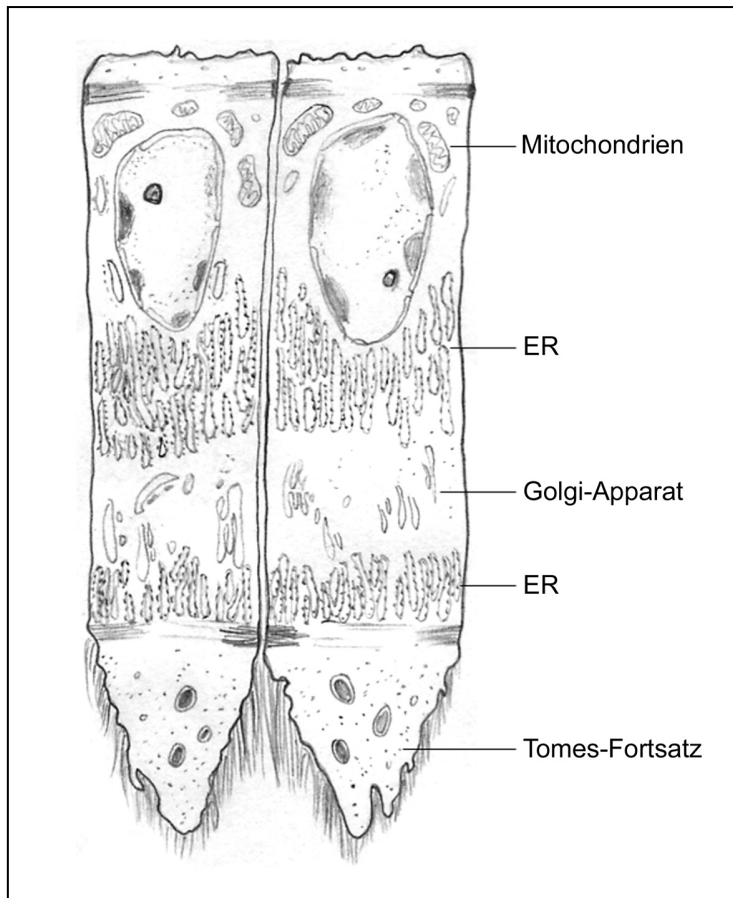


**Abb.3: Spitze einer Zahnanlage**

Schmelz- und Dentin werden gebildet. Zuerst produzieren die Odontoblasten unverkalktes Prädentin, das mineralisiert. Die Ameloblasten bilden Schmelzprismen, die im Bereich der Tomes-Fortsätze abgeschieden werden und auch sekundär mineralisieren (eigene Zeichnung).

Die Zähne der Säugetiere bestehen aus drei Zahnhartsubstanzen, Schmelz, Dentin und Zement. Man unterscheidet das Wurzeldentin, welches von Zement überlagert wird und das Kronendentin, das von einer Schmelzschicht überzogen ist. Der Zahn befindet sich in einem Knochenfach im Kiefer und ist mit Haltefasern über das Periodontalligament (Bereich des Parodontiums) mit dem umliegenden Knochen befestigt. Die Wurzelspitze besitzt ein Foramen, durch das Nervenfasern, Blut- und Lymphgefäße ziehen, um eine ausreichende Versorgung des Zahnes zu gewährleisten.

### 2.3.1. Amelogenese



**Abb.4: Sekretorischer Ameloblast.** Die Zeichnung zeigt die unterschiedlichen Zonen im Zytoplasma eines sekretorischen Ameloblasten (eigene Zeichnung; modifiziert nach (Provenza 1988)).

Schmelz (Enamel) wird von den Zellen des inneren Schmelzepithels, den Ameloblasten (auch Adamantoblasten genannt) gebildet. Die Umwandlung des Epithels geht von der Höckerspitzenregion aus, bis alle Zellen in Ameloblasten differenziert sind (Deutsch und Pe'er 1982; Fincham et al 1983; Robinson et al 1981). Die Amelogenese erfolgt immer nach der Dentinogenese. Des Weiteren sind die Zellen des inneren Schmelzepithels notwendig um Odontoblasten zur Dentinbildung anzuregen. Das produzierte Dentin der Odontoblasten ist wiederum der Initiator für eine weitere Differenzierung des inneren Schmelzepithels (Kagayama et al 1997; Otsuji et al 1999; ten Cate 1994; Zeichner-David et al 1997), ein schönes Beispiel für den Prozess der reziproken Induktion.

Während Zahnschmelz ektodermalen Ursprungs ist, stammen alle anderen Hartgewebe vom Mesoderm ab (Lundgren et al 1998; Torres-Quintana et al 2005). Die Ameloblasten sezernieren eine Schmelzmatrix, die durch Mineralisierung zur härtesten Substanz des Körpers wird (Provenza 1988).

Adulte Ameloblasten besitzen eine basale Seite, die an die Schmelzpulpa grenzt und eine apikale Seite, welche der Pulpa zugewandt ist. Im basalen Zytoplasma liegen viele Mitochondrien und ein länglicher Kern. In der Mitte der Zellen befinden sich viele raue ER-Zisternen und ein ausgedehnter Golgi-Apparat. Apikal und basal zwischen den Ameloblasten sind Zellkontakte wie z.B. Tight Junctions, Zonulae adhaerentes, Desmosomen und Nexus ausgebildet. Der Apex enthält zahlreiche Sekretgranula und Lysosomen, die im sogenannten Tomes-Fortsatz liegen. Die Granula werden exozytiert und beteiligen sich an der Schmelzmatrixbildung (Welsch 2003).

Der Schmelz besteht zu ca. 95% aus Hydroxylapatit, zu ca.1% aus organischer Matrix und zu ca. 4% aus Wasser (Hellwig 2003). Der hohe Mineralanteil verleiht dem Schmelz nur eine geringe Zugfestigkeit. Die Schmelzhärte wird auf der Mohsschen Härteskala eine Härte von 6-7 angegeben und steht damit zwischen der von Apatit und Quarz (Schroeder 2000).

Viele Kristalle werden zu einzelnen Schmelzprismen vereinigt. Ein Schmelzprisma hat einen Durchmesser von ca. 5µm und eine Länge von 3-9µm aufweist, wobei diese schwer zu bestimmen ist, da das Prisma in Windungen verläuft und die Krone verschiedene Schmelzdicken aufweist (Welsch 2003). Die Prismenverbände können unterschiedliche Konfigurationen annehmen. Zum einen gibt es die Anordnung in einer Art Schlüssellochstruktur, zum anderen solche, die als Pferdehuftyp oder zylindrischer Typ bezeichnet werden (Hellwig 2003).

Der Prozess der Schmelzbildung verläuft nicht kontinuierlich, sondern schubweise, wodurch eine spezielle Streifung entsteht, die Retzius Streifen (Li und Risnes 2004; Welsch 2003). Eine andere Form von Wachstumslinien entstehen, indem sich Ameloblasten während ihrer Sekretion zurückziehen und sich hin und her bewegen und dabei eine Schmelzschicht hinterlassen, die wellenförmig verläuft und Hunter-Schreger-Streifung genannt wird (Gaspersic 1995).

Ameloblasten durchlaufen unterschiedliche Reifungsgrade mit jeweils anderen Funktionsphasen, so dass auch das Aussehen der Zellen, die Zellkontakte, und der Organellenbestand zu unterschiedlichen Zeitpunkten variieren. Man unterscheidet grob vier Phasen: 1) die Präameloblastenphase, 2) die Differenzierungsphase, 3) die Sekretionsphase und 4) die Maturationsphase. Zunächst sind die Ameloblasten flach und sezernieren eine homogene Schmelzschicht. Das raue ER nimmt an Größe zu, freie Polysomen sind zu finden, der Golgi-Apparat ist aber noch sehr klein (Phase2) (Katchburian und Holt 1972).

Anschließend wachsen die Zellen stark in die Länge und hinterlassen einen Cytoplasma-Fortsatz (Tomes-Fortsatz) (Katchburian und Holt 1972). Sie sind nun in der sekretorischen Phase (Phase3) und besitzen ein ausgedehntes raues ER, einen großen Golgi-Apparat, viele Vesikel und Sekretgranula (Katchburian und Holt 1972; Kubota et al 2005). Es entstehen die Schmelzprismen und der isoprismatische Schmelz. Nach der Sekretionsphase (Phase4) verlieren die Zellen an Größe, die Zellorganellen werden weniger, die anfänglich produzierte Matrix wird resorbiert. Die Ameloblasten werden wieder flacher, produzieren aber, bevor sie gänzlich rückgebildet werden, noch eine homogene Schicht Schmelz (Smith und Warshawsky 1977). Eine Übersicht über die verschiedenen Ameloblasten-Stadien gibt Abb.5.



**Abb.5: Differenzierungsphasen eines Ameloblasten.** Die Zeichnung zeigt die verschiedenen Stadien, die ein Ameloblast während seiner Entwicklung durchläuft. A= Zytologische Veränderungen des inneren Schmelzepithels. B= Es differenzieren sich die Präameloblasten. C = Sekretorischer Ameloblast mit hypertrophischen Zellorganellen, der Tomes-Fortsatz bildet sich. D= Schmelzbildung. E= Alternde Ameloblasten, die Zellorganellen sind reduziert (eigene Zeichnung; modifiziert nach D.V.Provenza, 1988(Provenza 1988)).

Die Ameloblasten sind mit anderen Zellen der Schmelzpulpa, vor allem durch Nexus, verbunden (Welsch 2003). Dem basalen Teil der Ameloblasten liegt eine dicke Schicht der Schmelzpulpa direkt an. Diese Zellschicht wird auch Stratum intermedium genannt. Die



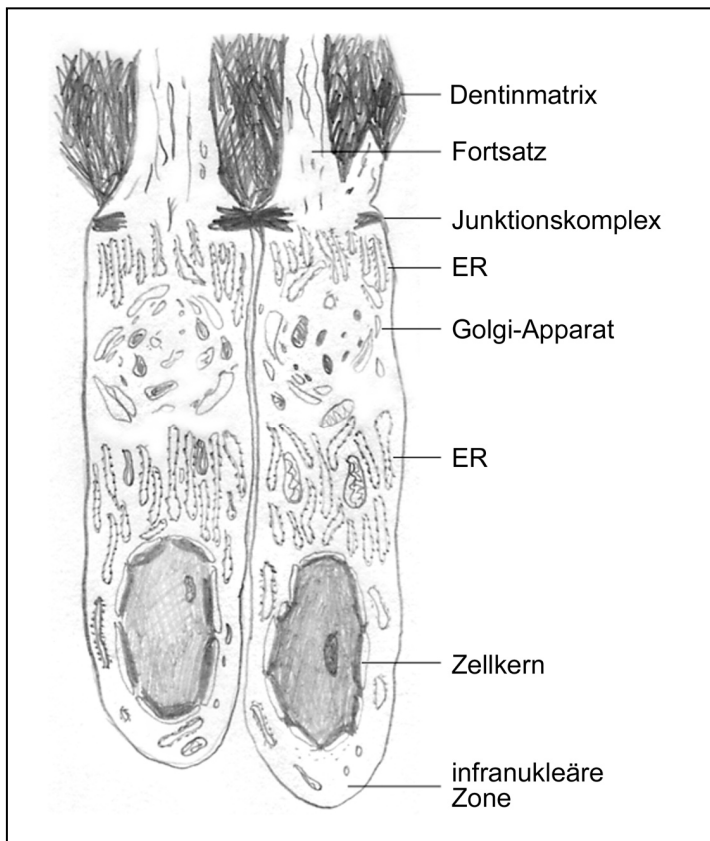
Kalziumzufuhr in diese Zellschicht erfolgt transzellulär, wobei eine Kalzium-ATPase in der Membran der Ameloblasten eine wichtige Rolle spielt (Welsch 2003).

An der Schmelzbildung sind verschiedene Proteine beteiligt. Anfangs spielen die Amelogenine (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bindene Proteine) und später die Enameline (saure glykolysierte Proteine) eine wichtige Rolle in der Amelogenese (Hu et al 2001; Janones et al 2005; Welsch 2003). Details hierzu sind aber erst wenige bekannt. Zu den am besten untersuchten Proteinen der extrazellulären Matrix zählt das Amelogenin. Daneben wurden noch weitere sogenannte „Non-Amelogenine“ wie Enamelin, Ameloblastin, Tuftelin und Tuft Protein in der Literatur beschrieben.

Die Zahnleiste und das Schmelzorgan werden durch Epithelzellen gebildet, die durch spezifische Cytokeratin-Filamente charakterisiert sind. Diese Intermediärfilamente bestehen aus verschiedenen Cytokeratinen, die von den Epithelzellen produziert werden (Domingues et al 2000). Deshalb sind Antikörper gegen diese spezifischen Cytokeratine auch gute Marker zum Nachweis der Ameloblasten (Ravindranath et al 2001).

Ein entsprechender anti-PanCytokeratin-Antikörper (PCK 26) wurde deshalb in dieser Dissertation zur Markierung der Ameloblasten verwendet. Man nimmt an, dass Interaktionen zwischen Amelogenin und diesem Filamentsystem bestehen (Ravindranath et al 2003; Ravindranath et al 2001; Tabata et al 1996).

### 2.3.2. Dentinogenese



**Abb.6: Darstellung sekretorischer Odontoblasten.** In dieser Zeichnung werden die verschiedenen zytoplasmatischen Zonen eines sekretorischen Odontoblasten beschrieben. (eigene Zeichnung; modifiziert nach (Provenza 1988)).

Die Odontoblasten sind Zellen, die für die Dentinbildung zuständig sind. Dentin ist die Zahnhartsubstanz, die den größten Anteil des Zahnes ausmacht und besteht zu 70 Gew% aus anorganischem Material, zu 20 Gew % aus organischem Material und zu 10 Gew% aus Wasser (Welsch 2003). Die organische Matrix des Dentins enthält vor allem Kollagen I, Proteoglykane und Glykoproteine (Carda und Peydro 2006; Linde und Goldberg 1993; Welsch 2003). Es gibt verschiedene Arten von Dentin, wobei das Zahnalter und der Ort der Dentinentstehung für deren Differenzierung eine Rolle spielt (Provenza 1988). Ebenso bestehen in der Dentinzusammensetzung auch zwischen verschiedenen Spezies Unterschiede: Zu einem das stetig wachsende Dentin der Nager und zum anderen das periodisch wachsende des Menschen. (Linde und Goldberg 1993).

Odontoblasten stammen aus dem Mesektoderm, ursprünglich entstanden aus eingewanderten Zellen der Neuralleiste während der Kopfentwicklung (Arana-Chavez und Massa 2004). Die Differenzierung der Odontoblasten beginnt an der Spitze, der sich später entwickelnden

Zahnkrone. Die dentinbildenden Zellen durchgehen ebenso wie die Ameloblasten verschiedene Entwicklungsstadien. Man kann in deren Differenzierung vier Stadien unterscheiden: Stadium der Präodontoblasten, die Sekretionsphase, die Übergangsphase und alternde Odontoblasten. Während der Sekretionsphase liegt eine hohe Anzahl von Organellen vor, die Zellkörper sind lang gewachsen. Bei alternen Zellen nimmt die Organellenanzahl wieder ab und die Zellkörper verlieren an Höhe (Couve 1986). Die Präodontoblasten (Phase 1) haben einen minder ausgeprägten Golgi-Apparat und weniger ER. Sobald sie sich weiter entwickeln, nehmen diese Zellorganellen an Größe zu. Sekretorische Odontoblasten (Phase 2) sind stark polarisierte und an Höhe zunehmende Zellen mit zahlreichen Zellorganellen (Golgi, sekretorische Vesikel und Mitochondrien), die sich oberhalb des Zellkerns befinden. Zisternen des rauen endoplasmatischen Retikulums sind im Gegensatz hierzu weiterhin im basalen Teil der Zellen ausgeprägt. Mithilfe des Elektronenmikroskopes kann man einige kleine Matrix-Vesikel im Manteldentin erkennen, die am distalen Ende der Zellen abgeschnürt werden. Proteoglykane sind an diese Matrixvesikel assoziiert, von denen man annimmt, dass sie Kalziumionen binden können und damit als Mineralisationskeime wirken (Arana-Chavez und Massa 2004; Couve 1986). Wenn sich die Zellen in der Übergangsphase (Phase 3) befinden, sind sie sehr schmal, nicht mehr so stark polarisiert und besitzen eine reduzierte Anzahl an Organellen (Couve 1986). Sobald die Odontoblasten altern (Phase 4) werden sie kleiner und noch schmaler. Nur wenige Zellorganellen befinden sich noch oberhalb des Zellkerns, stattdessen kommen dort mehrere Fettvakuolen vor. Unterhalb des Kernes (basal) ist in diesen Zellen somit ein Raum im Cytoplasma entstanden, der mit den an Anzahl und Größe reduzierten Organellen gefüllt ist (Couve 1986). Odontoblasten stellen alle Dentinmatrixbestandteile her und sezernieren diese auch. Das ist der Grund, warum die Organellen in der Sekretionsphase stark an Größe zunehmen (Arana-Chavez und Massa 2004). Ein Mikrotubulusnetzwerk im Cytoplasma der Odontoblasten sorgt dafür, dass ausreichend sezerniert und Dentinmatrixvesikel abgeschieden werden können (Sasaki und Garant 1996). Die differenzierten Odontoblasten bilden eine säulenförmige Zelllage, welche am äußeren Rand der Pulpa liegt. Noch bevor die Ameloblasten mit der Schmelzmatrixsekretion beginnen wird Dentin gebildet (Arana-Chavez und Massa 2004). Anfangs sezernieren Odontoblasten das Prädentin, welches später zwischen den Odontoblasten und dem mineralisierten Dentin liegt. Das Prädentin ist eine unmineralisierte organische Matrix, welche vor allem Kollagen I enthält. Sie entsteht während der Dentinogenese und bleibt während der weiteren Zahnentwicklung bestehen. Die Mineralisierung zum definitiven Dentin erfolgt durch Ablagerung von Apatitkristallen. Die

Dentinbildung weist dabei Ähnlichkeiten mit der Knochenentwicklung auf (Linde und Goldberg 1993). Die Mineralisierung des Dentins beginnt vor der des Schmelzes. Durch die Dentinbildung ziehen sich die Odontoblastenzellkörper allmählich von der Basalmembran der Ameloblasten zurück und wandern dabei in Richtung der Pulpa (Tsuchiya et al 2002). Zurück bleibt ein Fortsatz, die Tomes-Faser, die in einem dünnen Kanälchen liegt und das Dentin vollständig durchzieht (Arana-Chavez und Massa 2004; Welsch 2003). In diesem Odontoblastenfortsatz fehlen wichtige Zellorganellen, dafür findet man hier eine Menge von Filamenten und Mikrotubuli (Linde und Goldberg 1993). So bleiben die Odontoblastenzellkörper mit dem Dentin in Verbindung und können auf einem noch nicht vollständig geklärten Wege Schmerz über Vermittlung freier Nervenenden weiterleiten (Arana-Chavez und Massa 2004). Einen sehr kleinen Part des organischen Materials nehmen Fette ein ( $< 2$  Vol%). Es gibt keine einheitliche Zusammensetzung der Fette; es kommen sowohl Phospholipide als auch Cholesterin, Cholesterin-Ester und Triacylglycerin darin vor. Man hat herausgefunden, dass es zu einer schlechteren Mineralisation führt, wenn man Ratten einer speziellen fettarmen Diät unterzieht. Man weiß weiterhin, dass Phospholipide Calcium binden, was noch durch die Anwesenheit von Phosphat-Ionen gefördert wird (Linde und Goldberg 1993). Odontoblasten enthalten Vimentin-Filamente, typische Intermediärfilamente mesenchymaler Herkunft, weshalb Antikörper gegen diese Filamente zur Markierung von Odontoblasten verwendet werden können (Josephsen et al 1999).

## **2.4. Zielsetzung der Arbeit**

Durch ein komplettes Fehlen oder eine fehlerhafte Biogenese der Peroxisomen beim Menschen entstehen Multiorgandefekte und Missbildungen bei betroffenen Kindern, die in schwerster Form bereits während des ersten Lebensjahres zum Tode führen. Im Vordergrund dieser schweren Erkrankungen (Zellweger Syndrom) stehen Defekte des Zentralnervensystems und degenerative Leberveränderungen (Gärtner 2000).

Patienten mit milderen Verlaufsformen, die das Erwachsenenalter erreichen, können neben anderen Organdefekten auch Zahnmißbildungen aufweisen, was die Relevanz der Peroxisomen in der Entwicklung der Zähne und Zahngewebe verdeutlicht. So wies der beschriebene Patient in der Studie von Poll-The und Kollegen einen veränderten Zahndurchbruch, Fehlstellungen und Schmelzveränderungen (Enamelhypoplasien) der Zähne auf (Poll-The et al 2004). Aufgrund dieser Tatsache ist anzunehmen, dass Peroxisomen und der reguläre peroxisomale Stoffwechsel auch in der Zahnentwicklung und Ausdifferenzierung der Zahngewebe eine wichtige Rolle spielen. Jedoch gibt es bislang keinerlei Information zum peroxisomalen Kompartiment in Zahngeweben. Aus diesem Grund sollte in dieser Dissertation die morphologische Charakterisierung des peroxisomalen Kompartiments in unterschiedlichen Zahngeweben durchgeführt werden. Erste Zielsetzung war es folglichweise eine optimale Methode zur Lokalisation von Peroxisomen in Zahngewebe zu erarbeiten. Bislang waren Peroxisomen in der internationalen Literatur in Zahngewebe nicht auf lichtmikroskopischer Ebene beschrieben worden. Dies lag wahrscheinlich daran, dass die Sensitivität der verwendeten Verfahren nicht dazu ausreichte um eine entsprechende Lokalisation der Organellen vorzunehmen. Mithilfe von einem sensitiven 3-Schrittverfahren (ABC-Peroxidase Technik) und mit der noch sensitiveren indirekten fluoreszenzmikroskopischen Methode, sollten in dieser Arbeit die optimalen Voraussetzungen zur Lokalisation unterschiedlicher peroxisomaler metabolischer Enzyme, wie auch von Membrantransportern und Biogeneseproteinen in Zahngeweben unterschiedlicher Entwicklungsstufen, geschaffen werden. Mittels der etablierten Verfahren sollten erste Aussagen über die Verteilung der Organellen in unterschiedlichen Zahngeweben und des Vorkommens der verschiedenen Markerproteine getroffen werden, um gegebenenfalls Aussagen über die Heterogenität der Peroxisomen in Zahngeweben zu machen. Die neu etablierten Verfahren sollten dann zum Vergleich von Wildtyptieren und PEX11 $\beta$  Knockoutmäusen, mit einer Störung der Peroxisomenproliferation, eingesetzt

werden, um eventuelle Unterschiede in der Zahnentwicklung bei peroxisomalen Biogenesestörungen nachzuweisen.

Die Ergebnisse der Arbeit zeigen eindeutige Veränderungen und Funktionsunterschiede der Peroxisomen in unterschiedlichem Zahngewebe während der Entwicklung und signifikante Veränderungen der Zahnentwicklung bei den PEX11 $\beta$  Ko-Mäusen. Die Befunde weisen somit auf eine wichtige Funktion der Peroxisomen während der Zahnentwicklung hin.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Versuchstiere, Geräte und Materialien

##### 3.1.1. Versuchstiere

Die verwendeten, Wildtyp-Mäuse mit genetischen Hintergrund C57BL/6J wurden von Charles River Laboratories erworben und in einer spezifisch pathogenfreien Umgebung im Zentralen Tierlabor (ZTL) der Justus-Liebig Universität unter standardisierten Bedingungen gehalten (Temperatur:  $22 (\pm 2) ^\circ\text{C}$ , Luftfeuchtigkeit:  $55 (\pm 5) \%$ ). Der Tag-Nacht-Rhythmus betrug 12 Stunden. Sterilisiertes pelletiertes Pressfutter (Standarddiät) und Trinkwasser stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Die Haltung der Tiere erfolgte unter Berücksichtigung der Richtlinien des Tierschutzgesetzes der Bundesrepublik Deutschland.

Die transgenen PEX11 $\beta$  Knockout-Mäuse mit C57BL/6J genetischem Hintergrund wurden unter vergleichbaren Bedingungen im ZTL durch Verpaarung heterozygoter Tiere gezüchtet.

##### 3.1.2. Laborgeräte

###### Alphabetische Auflistung der benutzten Laborgeräte unter Angabe der Bezugsquelle:

Analysenwaage PB3002 DeltaRange®	Mettler Toledo, Giessen
Biometra Trio Thermoblock	Biometra, Westburg b.V., Leusden, Niederlande
Bio-RAD GelDoc 2000 (Geldokumentationsanlage)	BioRad Laboratories GmbH, München
Bio-RAD PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Fluoreszenzmikroskop (DMRD)	Leica, Wetzlar
Gelelektrophoresekommer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gewebeeinbettautomat	Leica, Wetzlar
Heizmagnetrührer	IKAMAG® Janke & Kunkel, IKA®, Staufen
Kryomikrotom CM 3050	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Labor-Spülautomat G 7883 CD	Miele Professional, Gütersloh
Lichtmikroskop DMLM	Leica, Wetzlar
Rotations-Mikrotom Leica RM 2135	Leica, Wetzlar
Mikrowellenofen, intellowave	LG electronics Deutschland GmbH, Willich
P.A.L.M. Microlaser	P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried

Paraffin-Ausgiessstation „Paramat“	Paul Scherrer Institut, Villingen, Schweiz
pH-Meter inolab pH720	WTW GmbH & Co.KG, Weilheim
Projektionsmikroskop „Visopan“	Reichert, Optische Werke A.G.Wien, Österreich
Reinstwasseranlage Milli-Q	Millipore, Bedford, MA, USA
Vortexer VF2	Janke & Kunkel, IKA® Labortechnik, Staufen
SmartspecTM 3000 spectrophotometer	Bio-Rad, Heidelberg
Streckbad WB 24	E.Vieth, Mikrotome, Medizintechnik GmbH, Wiesmoor
Timer TR 118	Oregon Scientific GmbH, Neu-Isenburg
Tischzentrifuge (Biofuge Fresco)	Heraeus, Hanau
Ultra-Turax T25	Janke & Kunkel GmbH & CoKG, Staufen
Wärmeplatte 13800	Medax Nagel GmbH, Kiel

### 3.1.3. Verbrauchsmaterialien

#### Alphabetische Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien unter Angabe der Bezugsquelle:

Deckgläschen, Menzel	Fischer Scientific GmbH, Schwerte
Einbettkassetten	Leica, Microsystems, Bensheim
Einbettgeschälchen, Metall	Leica, Mikrosysteme, Bensheim
Eppendorfgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Erlenmeyerkolben	Fischer, Scientific GmbH, Schwerte
Glasgefäße	LABOR-BRAND, H.Kahlensee, Giessen
Immersionsöl	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Immersionsöl, fluoreszenzfrei	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Laborflaschen, Fischerbrand	Fischer, Scientific GmbH
LPC-Microfuge Tubes	P.A.L.M.Microlaser Technologies GmbH, Bernried
Messzylinder	Duran®, Hirschmann® EM Techcolor, Deutschland
Mikrotomklingen S-35, R-35	Produkte für Medizin AG, Köln
Objekträger SuperFrost®Plus	R.Langenbrinck, Labor-u. Medizintechnik, Teningen
PalmMembraneSlides	P.A.L.M. Microlaser Technologies GmbH, Bernried
PAP-Pen für Immunfärbungen	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Paraffin Paraplast Plus	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim



Pipettenspitzen	Starlab, Ahrensburg
Reinigungsmilch für Leitz-Objektive	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Safe Lock Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Tubes Standard 13800	Sarstedt, Nürnbrecht

### 3.1.4. Chemikalien

#### Alphabetische Liste der verwendeten Chemikalien und Proteine unter Angabe der Bezugsquelle:

Agarose LE	Roche Diagnostics AG, Mannheim
Bovine Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Citronensäure-Monohydrat	Merk KGaA, Darmstadt
DAPI	Merk KGaA, Darmstadt
DePeX	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg
4',6-Diamidino-2-phenylindol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merk KGaA, Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
DNA Standard Ladder 100bp	Promega, Madison, USA
dNTP Mix	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
„First-Strand Buffer“ = (c-DNA Synthese Puffer)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gelladepuffer	Promega, Madison, USA
Kaliumdihydrogenphosphat	Merk KGaA, Darmstadt
Ketamin	Ratiopharm GmbH, Ulm
Mayers Hämalaunlösung	Merk KGaA, Darmstadt
Mowiol	Farbwerke Hoechst, Frankfurt
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Natronlauge	Merk KGaA, Darmstadt

Oligo (dT) <sub>12-18</sub> Primer	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
PCR-Puffer	Eppendorf AG, Hamburg
Propylgallat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RNaseOUT™ (40 U/μl)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Rompun	Bayer AG, Leverkusen
Sedastress	Eurovet Animal Health BV, Bladel, Niederlande
Steriles Wasser	Braun Melsungen AG, Melsungen
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
TAqDNApolymerase	Eppendorf AG, Hamburg
Tri-Natriumcitrat-di-hydrat	Merk KGaA, Darmstadt
Trypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tween 20	Merk KGaA, Darmstadt
Tris	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Wasserstoffperoxid	Merk KGaA, Darmstadt
Xylol	Merk KGaA, Darmstadt

### 3.1.5. Verwendete Kits

#### Alphabetische Auflistung der verwendeten Kits unter Angabe der Bezugsquelle:

Avidin/Biotin-Blocking Kit	Vector Biologische Produkte GmbH, Wertheim
ExtrAvidin Rabbit Peroxidase-Staining Kit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Nova Red Peroxidase-Substrat	Vector Laboratories, Burlingame, CA,USA
RNeasy®Lipid Tissue Mini Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden
RNeasy®MicroKit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden
SuperScript II RT-Kit	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

### 3.1.5. Verwendete Primer

**Alphabetische Auflistung der verwendeten Primer.** Alle Primer wurden von Operon Biotechnologies GmbH (Köln) synthetisiert.

**Tabelle 3: In der Tabelle sind alle in der Dissertation verwendeten Primer für die RT-PCR Analyse von mikrodissektierten Zahngewebe zusammengefasst.**

Gen	Primer-Sequenz 5'... 3'	Annealing-Temperatur (°C)	Produktgröße (bp)
<b>Amelogenin</b>	Vorwärts ATGGCTGCACCACCAATCAT	64	150
	Rückwärts ATGGAGTGGTGGCCAGGAAC		
<b>Dentinsialophosphoprotein (DSPP)</b>	Vorwärts TGAGAAATCAGCTGCCCACAGT	64	150
	Rückwärts CTTTCGTCACCTCCGTTAGATTCTG		
<b>Katalase</b>	Vorwärts CACCAGATACTCCAAGGCAAAGG	64	371
	Rückwärts TAGCCATTTCATGTGCCGGTGA		
<b>Cytokeratin 14 (K14)</b>	Vorwärts AGAGGACGCCACCTTTCATC	64	150
	Rückwärts TCGTGGGTGGAGACCACCTT		
<b>Peroxin 14 (PEX14)</b>	Vorwärts CACTGGCCTCTGTCCAAGAGCTA	64	300
	Rückwärts CTGACAGGGGAGATGTCACTGCT		
<b>28s rRNA</b>	Vorwärts CGAAATGCAAGCACGGAGAGT	64	250
	Rückwärts TCGTCCTCCACGATATGGAAGAT		
<b>Vimentin</b>	Vorwärts AAGGTGAAATTGGCTAACTTTCACAAG	64	150
	Rückwärts ACTTTCACGCAGTGCCGAAC		

### 3.1.6. Verwendete Antikörper

Tabellen 4 und 5 geben eine Übersicht über die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper gegen verschiedene peroxisomale Proteine, die für die immunhistochemischen und immunfluoreszenzmikroskopischen Inkubationen verwendet wurden.

**Tabelle 4: Primärantikörper gegen peroxisomale Proteine und eingesetzte Verdünnungen**

Folgendes Antigen	Isoliert aus folgender Tierspezies	Verdünnung IHC/ ABC	Verdünnung Immunfluoreszenz	Bezugsquelle
Acyl-CoA-Oxidase I, 51kD Untereinheit	Kaninchen		1:1000	Prof.P.VanVeldhoven, Leuven, Belgien
Katalase	Kaninchen	1:1000	1:4000	Prof. Crane, Brisbane Qld, Australien
Acyl-CoA-Oxidase I, 23kDa Untereinheit	Kaninchen		1:1000	Prof.P.VanVeldhoven, Leuven, Belgien
OxPhosIII (KomplexIII d.Atmungskette)	Maus		1: 500	Invitrogen/Mol. Probes Deutschland
PanCytokeratin (PCK-26)	Maus		1:10500	Abcam/Biozol Deutschland
Pex13p	Kaninchen		1: 500	Prof. Crane, Brisbane Qld, Australien
Pex14p	Kaninchen	1:1000	1: 1000	Prof. Crane, Brisbane Qld, Australien
ABCD3/PMP70	Kaninchen		1: 1000	Prof. Osumi/Himeji City, Japan
ABCD3/PMP70	Schaf		1: 250	Prof. J. Gould, Baltimore MD, USA
-SKL=Serin-Lysin-Leucin) (PTS1-Targeting-Signal)	Kaninchen		1:1000	Prof. Crane, Brisbane Qld, Australien
Vimentin	Maus		1: 5000	Sigma Deutschland

**Tabelle 5: Kommerzielle Sekundärantikörper und eingesetzte Verdünnungen**

Folgende Markierung	Antigen	Verdünnung	Bezugsquelle
Esel-anti-Kaninchen	Alexafluor488 (grün)	1:1000 (IF)	Invitrogen/Mol.Probes Deutschland
Esel-anti-Schaf	RhodamineRot	1:400 (IF)	Jackson/Dianova Deutschland
Ziege-anti-Maus	TexasRot	1:400 (IF)	Vector USA

### 3.2. Gewebefixierung und Einbettung

Neben der Fixierung durch Einlegen in die Flüssigkeit (Immersionsfixierung) ist seit langem auch die Fixierung mittels Durchspülen auf dem Gefäßweg üblich (Perfusionsfixierung) (Romeis 1989). Dieses Verfahren erbringt bessere Resultate als die Immersionsfixierung und ist sowohl als Fixierung für Immunhistochemie und Immunfluoreszenz geeignet.

#### 3.2.1. Fixantien und Puffer

##### Fixierungs-Lösung

Fixans für die Immunhistologie und Immunfluoreszenz

4% Paraformaldehyd (w/v)

2% Saccharose (w/v)

in PBS (s.u.)

pH 7,4; immer frisch angesetzt

##### PBS („Phosphate buffered saline“) 10x Stammlösung

1,37 M NaCl

81 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

14 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7,4

##### Citratpuffer ( 10 mM )

Lösung A : 2,1g C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> • H<sub>2</sub>O ad 100 ml a.d.

Lösung B : 14,7g C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>Na<sub>3</sub>O<sub>7</sub> • H<sub>2</sub>O ad 500 ml a.d.

15ml Lsg. A + 85 ml Lsg. B, auffüllen mit a.d. bis 1000 ml

**Entkalkungs-Lösung = 10%EDTA-Lösung**

10% EDTA (w/v)

0,9% NaCl (w/v)

20 mM Tris

pH 7,4

**3.2.2. Entnahme der Föten und Perfusionsfixierung**

Die Festlegung der spezifischen Zeitpunkte für die Entnahme der Mausföten richtete sich nach der Tabelle nach Ruch (Schroll 2004).

Schwangere Mausweibchen mit Föten der intrauterinen Entwicklungsstufen E13.5, E15.5, E18.5 wurden mit einem speziell dafür angefertigten Gasverdampfer narkotisiert. Hierfür strömt Pressluft in den Behälter, der das Isoflurangas beinhaltet. Von diesem führten Schläuche in eine Narkotisierungskammer aus durchsichtigem Plastik mit Deckel, in dem die Maus gesetzt wurde. Bei Öffnung des Dreivegeahns strömt 2 Vol% Isoflurangas ein.

War die Maus narkotisiert, wurde sie herausgenommen, auf den Rücken gelegt und über eine Kopfmassage (abgeschnittenes 50ml Gefäß), in die stetig Isofluorangas strömte, weiter narkotisiert.

Das Fell an der Bauchdecke der schwangeren Mäuse wurde mit einem Längsschnitt medial geteilt. Danach wurde die Bauchhöhle eröffnet, die Fett- und Hautschichten seitlich abpräpariert und die Bauchorgane exponiert. Beide Uterushörner wurden freigelegt und die einzelnen Embryos in den Eihäuten samt Plazenta dargestellt. Dabei war darauf zu achten, dass der Stamm der Arteria uterina nicht verletzt wurde. Die Embryonen wurden jeweils über peritoneale Injektion von einem Narkotikumgemisch narkotisiert und nach Fixierung der Extremitäten mit Nadeln wurde der Thorax zur Perfusion über den linken Ventrikel eröffnet. Zur Perfusionsfixation wurde eine 5ml Spritze mit Fixierlösung gefüllt, eine Butterflykanüle wurde angedockt und der Schlauch dieser Kanüle mit NaCl aufgefüllt. Dies wurde über Ansaugen mit der Spritze durchgeführt, bis die Luft aus dem Schlauchsystem in die Fixierflüssigkeit entwichen war. Das NaCl wurde zur Spülung des Gefäßsystems vor dem Zuführen der Fixierlösung verwendet, um Verstopfungen von Kapillaren zu vermeiden und eine optimale Fixierung zu gewähren.

Bei größeren Tieren wurde zusätzlich Heparin und Natriumnitriprussit über NaCl zugeführt, damit das Blut nicht gerann und sich die Kapillargefäße weiten.

Nach medianer Öffnung des Thorax durch Durchtrennung des Sternums wurde das Herz zwischen den beiden dunklen Lungenflügeln sichtbar. Bei den Foeten waren entsprechend Foramen ovale und Ductus arteriosus noch offen. Mit der Kanüle punktierte man in Richtung linken Ventrikel. Nach guter Insertion der Nadel und Eröffnung des rechten Herzhohls wurde mit Hilfe der verbundenen Spritze die Perfusionsfixierung unter gleichbleibenden moderaten Druck durchgeführt. Eine gute Perfusion war an der Hellfärbung der Leber und der restlichen peripheren Organe festzustellen. Bei ungenügender Qualität der Perfusionsfixierung wurde zusätzlich Fixans in die Bauchhöhle und über die große Fontanelle in den Schädel (unter Schonung des Gehirns) eingespritzt. Der komplette Mausfoetus nahm bei guter Fixierung eine helle Farbe an. Danach wurde der Foetus in ein mit PFA gefülltes Becherglas gelegt und über Nacht immersinsfixiert.

### **3.2.3. Perfusionsfixierung der neugeborenen und 1-3 Tage alten Tiere**

Narkose

*Ketamin*      *65mg/kg Körpergewicht*

*Xylazin*      *13mg/kg Körpergewicht*

*Azepromazin* *2mg/kg Körpergewicht*

Die neugeborenen Tiere wogen zwischen 1,3g und 2,0g. Die Narkoselösung wurde für etwa 10 Tiere (d.h. 20g) zusammengestellt.

Bei 20g :

*Ketamin*      = *13µl, (Ketamin 100mg/ml)*

*Rompun*      = *12µl, (Xylazin 20 mg/ml)*

*Sedastress*   = *4µl, (Azepromazin 10mg/ml)*

Ketamin, Xylazin und Azepromazin wurden nacheinander in der Spritze aufgezogen und gemischt. Die Injektion erfolgte intraperitoneal.

Nachdem die Maus anästhesiert war wurde der Thorax nach einem medianem Schnitt und seitlichem Abschieben der Brusthaut eröffnet. Hierzu fasste man den Processus xiphoideus, umschnitt ihn, hob ihn an und durchtrennte das Sternum mit einer Schere. Danach wurden die Thoraxhälften durch einen kleinen Spreizer auseinander gezogen, das Herz durch Spalten des Herzbeutels freigelegt und an seiner Spitze herausgezogen. Die Herzspitze wurde knapp abgeschnitten, so dass man in den rechten und linken Ventrikel einsehen konnte. Die Butterflykanüle wurde in den linken Ventrikel eingeführt. Für die Perfusion dieser Tiere war

die Kanüle an eine Perfusionspumpe angeschlossen, die nach erfolgter Insertion der Kanülennadel in den linken Ventrikel angestellt wurde. Die Perfusionsfixierung erfolgte über 5 Minuten. Es wurde stets darauf geachtet, das Schlauchsystem zur Perfusionsfixierung luftblasenfrei zu halten, um den Verschluss arterieller Gefäße durch sich lösende Luftblasen zu vermeiden. Die Mäuse wurden nach Eröffnung der Bauchhöhle und des Schädels durch sagittale Einschnitte anschließend 1 Tag in PFA immersionsfixiert.

#### **3.2.4. Perfusionsfixierung der adulten (3 Monate) alten Mäuse und Entkalkung der Gewebe**

Zu Beginn der Perfusion wurde den Mäusen intraperitoneal Heparin gespritzt, damit es nicht zur Blutgerinnung und Verstopfung von kleinen Gefäßen kam, bevor die Maus perfundiert war. Es folgte die Tötung mittels Genickbruch. Anschließend erfolgt dieselbe Präparation und Perfusion wie bei den Jungtieren.

Bevor die sagittalisierten Köpfe drei Monate alter adulter Mäuse eingebettet wurden, mussten sie 6 Wochen mit einer EDTA-Lösung entkalkt werden. Dafür wurden sie in einem, mit der EDTA-Lösung gefülltem, Schraubglas im Kühlfach bei 4°C aufbewahrt. Damit die Entkalkifizierung optimal verlief, wurden die Köpfe in Gaze im Glas aufbewahrt. Somit wurde gleichmäßiger Kontakt und Austausch mit der Entkalkungslösung erreicht. Jeden zweiten Tag wurde diese Lösung ausgetauscht.

#### **3.3. Paraffineinbettung**

Die Föten, die Jungtiere und die entkalkten Köpfe der erwachsenen Tiere wurden durch einen Medianschnitt alle längs halbiert. Nach Abtrennung der Kopfhälften vom Rumpf standen von jedem Tier 2 Kopf- und 2 Körperhälften zur Einbettung zur Verfügung. Nach Platzieren der Anteile mit der flachen Schnittfläche nach unten in Entwässerungskäfige, wurden diese in die erste Station mit 70% Ethanol des Gewebeeinfiltrationsautomaten gelegt und nach Entwässerung (Programm siehe Tab. 6) mit Paraffin infiltriert.

Die Einzelschritte der Paraffineinbettung sind in der nachfolgenden Tabelle aufgelistet. Diese Schritte entsprechen damit auch der Programmierung des Automaten.

**Tabelle 6: Programmierung des Gewebeeinfiltrationsautomaten**

<b>Lösung</b>	<b>Verweildauer</b>
70% Ethanol	1 ½ Stunden
80% Ethanol	1 ½ Stunden
90% Ethanol	1 ½ Stunden
96% Ethanol	1 ½ Stunden
3x100% Ethanol	1 ½ Stunden
4x Xylol	1 ½ Stunden
2x Paraplast	2 Stunden

Anschließend wurde das infiltrierte Gewebe in Ausbettungsschalen positioniert, mit einem beschrifteten Einmalhalter abgedeckt und mit Paraffin aufgefüllt. Nach Abkühlung waren die Blöckchen zum Schneiden mit einem Rotations- oder Schlittenmikrotom geeignet.

### **3.3.1. Paraffinschnitte**

Die Paraffinblöckchen wurden in dem Schnellhalter eines Rotationsmikrotoms der Firma Leica eingespannt und geschnitten. Zum besseren Schneiden wurden die Blöcke bei  $-20^{\circ}\text{C}$  kurz vorgekühlt, um dünnere Schnitte mit hoher Qualität fertigen zu können. Zusätzlich war das Mikrotom mit einem Spezialhalter ausgestattet, der es erlaubte, dass der Paraffinblock auch während des Schneidens mittels Eis gekühlt werden konnte.

Nach dem Schneiden wurde der Paraffinschnitt in einem Wasserbad mit einer Temperatur von ca.  $50^{\circ}\text{C}$  gestreckt. Dadurch werden kleine Unebenheiten aus dem Schnitt geglättet.

Danach wurden die Paraffinschnitte, mit einer Dicke von  $2\mu\text{m}$  auf einen beschichteten Objektträger der Firma Langenbrink aufgezogen und zum Trocknen für ca. 2-3 min auf eine Wärmeplatte gelegt. Diese Schnitte wurden anschließend für die Immunhistochemie und Immunfluoreszenz eingesetzt. Die Qualität der Paraffinschnitte und die Zusammensetzung der Gewebestrukturen der Kopfpräparate (Zahnvorstufen vorhanden oder nicht) wurde mit Hilfe von Phasenkontrastmikroskopie ermittelt.

### **3.4. Tiere für die Mikrodissektion**

Für die Methode der Mikrodissektion wurde 2 Tage alte Mäuse (C57BL/6J) getötet und die Köpfe dieser Tiere in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bis zum Gebrauch wurden sie bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Kopfpräparate wurden dann mit einem Gefriermikrotom (ca.  $7-10\mu\text{m}$ ) geschnitten.



### 3.5. Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Eine HE-Färbung wurde angefertigt, um eine klare Übersicht über die angeschnittenen Gewebestrukturen der Kopfpräparate zu erhalten. Die Färbung erfolgte nachdem in Tabelle 7 angegebenen Protokoll.

**Tabelle 7: Protokoll für die HE-Färbung**

Entparaffinieren:	ca. 20 Minuten im Wärmeschrank bei 60°C, 3xXylol (je 30s) bei Raumtemperatur
Rehydrieren:	2x 100% Ethanol, 1x 96%, 1x 90%, 1x 80%, 1x 70%, 1x 50%, 2x a.d. ( je 30s)
Kernfärbung:	10 Minuten Hämatoxilin
Bläuen:	10 Minuten unter fließendem Leitungswasser spülen
Cytoplasmafärbung:	1-2 Minuten Eosin
Dehydrieren:	Alkoholreihe: 50%, 70%, 80%, 90%, 96%, 2x100%, 3xXylol (je 30s)
Eindecken:	DePex

#### Hämatoxylinlösung

Die Hämatoxylinlösung (Mayers Hämalanlösung, Merk) (gebrauchsfertig), wurde 1:10 mit aqua dest verdünnt. Bei der Kernfärbung der immunhistochemischen Schnitte wurde die Hämatoxylinstammlösung 1:20 verdünnt.

#### Eosinlösung

100 ml aqua dest

1g Eosin (gelblich)

1 Tr. Eisessig

Die Gefrierschnitte wurden ebenfalls mit HE gefärbt, um die spezifischen Zellen, für die spätere Mikrodisektion, sichtbar zu machen. Die entsprechenden Blöcke, von denen die Schnitte abgenommen wurden, wurden bis zur Mikrodisektion ohne Veränderung bei –80°C verwahrt.

### 3.6. Immunfärbungen

#### 3.6.1. Prinzip der Immunreaktion in Schnitten

Durch die Kombination von Antikörpern unterschiedlicher Spezies können Mehrfachnachweise verschiedener Antigene im gleichen Schnitt durchgeführt werden. Hierbei achtet man darauf, dass der Primärantikörper nicht in der zu untersuchenden Spezies hergestellt wird, aus der die Gewebepreparate stammen, um den Nachweis gebundener Autoantikörper bei der Sekundärreaktion zu vermeiden. Weiterhin muss bei der Auswahl kombinierter Sekundärantikörper darauf geachtet werden, dass keine ungewollten Interspezies Kreuzreaktionen der kombinierten Antikörper auftreten. Generell sind die unten

beschriebenen indirekten Immunreaktionen sensitiver als die direkten (Nachweis mit direkt markierten Primärantikörpern). Bei indirekten Nachweisverfahren kann die Sensitivität durch die Zwischenschaltung von mehreren Detektionsschritten noch erhöht werden (s.u. ExtrAvidinsystem), was jedoch unter Umständen auch zu höheren Hintergrundreaktionen führen kann. Dabei kann die Sichtbarmachung der gebundenen Antigen-Antikörper-Komplexe über Enzym-gekoppelte Farbreaktion oder durch Fluoreszenz-markierte Sekundärantikörper erfolgen.

### **3.6.2. Immunhistochemischer Nachweis der peroxisomalen Proteine**

Der immunhistochemische Nachweis wurde an Paraffinschnitten paraformaldehydfixierten Gewebes durchgeführt. Es wurde streng darauf geachtet, dass die Schnitte nicht austrockneten, damit keine unspezifischen Kreuzreaktionen auftraten (z.B. evtl. Austrocknen des Primärantikörpers auf dem Schnitt bei über Nacht Inkubationen). Alle Inkubationen erfolgten bei Raumtemperatur.

### **3.6.3. Entparaffinieren**

Zu Beginn wurden die Schnitte über Nacht bei 60°C im Inkubator, anschließend noch zusätzlich mit Xylol bei Raumtemperatur entparaffiniert. Zur Rehydrierung wurden die Schnitte in eine absteigende Alkoholreihe mit 100%, 96%, 80%, 70%, 50%, a.d. für jeweils 2 Minuten überführt.

### **3.6.4. Antigenfreilegung und Antigenwiederherstellung**

Für in Formalin fixierte und in Paraffin eingebettete Gewebeproben ist meistens eine Vorbehandlung zur Sensitivitätssteigerung der Antikörperreaktion bzw. Demaskierung der Aldehyd-veränderten Antigene zur Antigenwiederherstellung in den Gewebeschnitten unerlässlich. Die am meisten verbreiteten Methoden zur Antigenherstellung sind Proteasevorbehandlung und Hitzebehandlung (Dinges et al 2000).

Für das in dieser Dissertation verwendete Gewebe erwies sich eine Kombination der Protease- und der Mikrowellenvorbehandlung als optimal.

Die Proteasewirkung beruht auf der Spaltung von Proteinquervernetzungen. Dadurch können auch Antigen- blockierende Bindungen an Proteinen entfernt werden. Hierbei korreliert die Proteolysezeit generell häufig mit der Fixierungsdauer, weshalb eine optimale und exakte Fixierung Voraussetzung für reproduzierbare und qualitative Ergebnisse ist. Zur Anwendung gelangen verschiedene Proteasen (Hartley 1970). Enzymkonzentration und Einwirkungsdauer

zur Wiederherstellung der Eigenschaften des nachzuweisenden Antigens müssen aufeinander abgestimmt werden. Bei inadäquater Verwendung kann es zur Verminderung der Immunreaktivität und zu einer oft beträchtlichen Gewebeschädigung kommen. Aufgrund der Erfahrungen aus unserem Labor habe ich Trypsin verwendet. Vorversuche von mir zeigten, dass eine Einwirkungsdauer von 15 Minuten für das Zahngewebe zu optimalen Ergebnissen führte. Die verwendete Konzentration (0,01% Trypsin) beruhte auf den Erfahrungen aus unserem Labor (Grabenbauer 2001; Karnati und Baumgart-Vogt 2008; Nenicu et al 2007).

Die Mikrowellenbehandlung wurde 3x5min in Citratpuffer pH 6.2 durchgeführt. Auch hier musste man die Zeiten und den Mikrowellenpuffer entsprechend des Gewebes und des wiederherstellenden Antigens mittels Vorversuche ermitteln. Die entsprechenden Inkubationsbedingungen sind in Tabelle 8 und 9 beschrieben.

### **3.6.5. Inhibition der enzymatischen Aktivität der Peroxidase**

Durch 5- minütige Verwendung von 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in aqua dest, wurde die enzymatische Aktivität der endogenen Peroxidase geblockt.

### **3.6.6. Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen**

Die Blocklösung bestand aus PBS-Albumin (4%) und 0,05% Tween 20, um die unspezifische Bindung der Antikörper an die Schnitte zu verhindern und die „Hintergrundfärbung“ schwach zu halten.

Des Weiteren ist der Lösung Avidin (siehe Tab.8a) zugesetzt worden, um endogenes Biotin abzusättigen, das sonst mit dem Biotin-konjugierten Zweitantikörper reagieren könnte. Vor allem in Mitochondrien und dem Zellkern ist Biotin vorhanden. Dieser Schritt wird für mindestens 2 Stunden durchgeführt. Die freien Biotin-Bindungsstellen des zugesetzten Avidins werden durch Zusetzen von Biotin in die Verdünnungslösung des Erstantikörpers abgesättigt (siehe 3.6.6.).

### **3.6.7. Erstantikörper**

Der Erstantikörper wurde mit einer Lösung aus 1% BSA in PBS, 0,05% Tween 20 sowie Biotin (4 Tropfen pro ml) verdünnt und die Lösung gleichmäßig auf die Schnitte verteilt. Danach erfolgte die Inkubation über Nacht bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer zum Vermeiden von Austrocknungsartefakten (s.o.)

### **3.6.8. Zweitantikörper**

Am nächsten Morgen wurde der, mit 1% PBSA und 0,05% Tween 20 verdünnte, biotinylierte Zweitantikörper aufgetragen. Die Verdünnung des biotinylierten Ziege-anti-Kaninchen Antikörpers war 1:100. Die Inkubation erfolgt bei Raumtemperatur für zwei Stunden.

### **3.6.9. ExtrAvidin-Meerrettich-Peroxidase**

Zur lichtmikroskopischen Lokalisation des gebundenen biotinylierten Sekundärantikörpers und zur Steigerung der Sensitivität des IHC-Verfahrens wurde Meerrettich-Peroxidase-gekoppeltes ExtrAvidin in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Die Schnitte wurden für 20 min inkubiert und somit die Antikörperbindungsstellen detektiert.

Das ExtrAvidin-System ist ein hochaktiviertes Reagenz und hat eine hohe Biotinbindungsspezifität, durch das aus dem Hühnerei gewonnene Avidin. Gleichzeitig führt es nur zu einer niedrigen Hintergrundfärbung durch aus *Streptomyces avidinii* isolierte Streptavidin.

### **3.6.10. Histochemischer Peroxidase-Nachweis**

Als Substrate für die Peroxidasereaktion dienten  $H_2O_2$  und NovaRed (Kit der Firma Vektor). Die Peroxidasereaktion wurde mit 1:2 verdünnter Lösung im Vergleich zum Herstellerprotokoll über eine Dauer von 7 Minuten durchgeführt. Sobald die NovaRed-Substratlösung auf die Schnitte aufgebracht wurde, erfolgte die schnelle Oxidierung und Auspräzipitation des Farbstoffes durch die Peroxidasereaktion. Es entstand ein dunkelroter bis brauner Farbniederschlag je nach Inkubationsdauer. Oxidierung und Präzipitation des Farbstoffes wurde mit aqua dest abgestoppt.

Die Schnitte wurden zur Zellkerndarstellung mit Mayers Hämatoxylin gegengefärbt und anschließend 10 Minuten mit Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden mittels einer ansteigenden Alkoholreihe dehydriert, in Xylol überführt und eingedeckelt.

### **3.6.11. Eindecken der Schnitte**

Die Schnitte wurden mit DePex, einem künstlichen Harz, eingedeckt. Vor der lichtmikroskopischen Auswertung der eingedeckten Präparate erfolgte über Nacht die Aushärtung bei Raumtemperatur.

Eine Zusammenfassung des enzymatischen Immunhistochemieverfahrens ist in Tabelle 8 aufgeführt.

**Tabellen 8a und b: Protokoll für die Immunhistochemie mit der ABC-Peroxidase-Methode an Paraffinschnitten**

Die Paraffin-Schnitte wurden über Nacht in den Wärmeschrank bei 60C° gestellt zum Abtropfen des meisten Paraffins

**Tabelle 8a:**

<b>IHC-Schritt und Behandlung</b>	<b>Verweildauer</b>
<b><u>1.Tag</u></b>	
Entparaffinieren: Xylol I, Xylol II, Xylol III	je 5 min
Reydrieren: 100%, 100%, 96%, 80%, 70%, 50%, aqua dest. 2x	je 3 min
Proteolyse: 0,01% Trypsin bei 37C° auf Wärmeplatte	15 min
Waschen in PBS	3 x 5 min
Citratpuffer pH 6.0 in Mikrowelle (600W)	5 min
Citratpuffer auffüllen	5 min
Aqua dest auffüllen	5 min
Abkühlen lassen bei RT (Zur Renaturierung der Proteine)	30 min
Waschen in PBS 2 x 5 min	
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> in aqua dest (als endogener Peroxidaseblock)	5 min
waschen in PBS	3 x 5 min
Schnitte auf Objektträger mit PAP-Pen Schnitte umfahren (als Eingrenzungsbarriere)	
Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen:	
4% PBSA + 0,05% Tween 20 + Avidin aus Kit (4 Tropfen pro ml)	
in feuchter Kammer	2 h
waschen in PBS	3 x 5 min
Primärantikörper auftragen:	
Verdünnungslösung: 1% PBSA + 0,05% Tween 20 + Biotin aus Kit (4 Tropfen. pro ml),	
Inkubation in feuchter Kammer bei RT	über Nacht

Tabelle 8b:

<b>IHC-Schritt und Verweildauer</b>	
<b><u>2. Tag</u></b>	
waschen in PBS, Negativkontrollen separat	3 x 5 min
Sekundärantikörper auftragen (Ziege anti-Kaninchen IgG-biotinyliert)	
Kit: Verdünnung 1:100	
Verdünnungslösung: 1% PBSA + 0,05% Tween 20 (in feuchter Kammer)	2h
Waschen in PBS	3 x 5 min
ExtrAvidin – Meerettich – Peroxidase	
Kit: Verdünnung 1:100	
Verdünnungslösung: 1% PBSA + 0,05% Tween 20	20 min
Nova Red (Kit)	
Kurz vorher pipettieren:	
2,5ml aqua dest + 30µl Lsg I → mischen	
+ 20µl Lsg II → mischen	
+ 20µl Lsg III → mischen	
+ 20µl Lsg IV → mischen	
Mischung auf den Objektträger	je 7 min
Aqua dest	2 x 2 min
Kernfärbung: Mayers Hämatoxylin 1:10	5 min
unter fließendem kaltem Leitungswasser spülen (zur Bläuung)	10 min
Dehydrieren: 50% 70%, 80%, 90%, 96%, 100%, 100%	je 2 min
Xylol I, Xylol II, Xylol III	je 5 min
Eindecken mit DePex	

### 3.7. Immunfluoreszenz-Färbung

#### 3.7.1. Immunfluoreszenz an Paraffinschnitten

Durch besondere Kombination von Primärantikörpern, die aus unterschiedlichen Spezies isoliert wurden, können auf dem gleichen Schnitt mehrere verschiedene Antigene nachgewiesen werden. Im Gegensatz zur Enzym-gekoppelten Immunhistochemie sind die sekundären Antikörper bei der Immunfluoreszenz mit einem Fluorochrom markiert, das bei Anregung mit Licht einer bestimmten Wellenlänge Licht einer längeren Wellenlänge emittiert. Die emittierten Licht-Signale zeigen somit das Vorhandensein des gesuchten Antigens an spezifischen Markierungsstellen in Gewebeschnitten. Die Auswertung dieser Präparate muss jeweils mit spezifischen Fluoreszenzfiltern und Fluoreszenzmikroskopen durchgeführt werden.

### 3.7.2. Antikörper-Einsatz

Auftragen der Antikörper und Freilegen der Antigen-Antikörper-Bindungsstellen erfolgte mit demselben Schema wie in der Immunhistochemie (Siehe Kap.3.6.2.-3.6.4.). Da das von uns ausgewählte Immunfluoreszenzverfahren eine höhere Sensitivität als das vorher beschriebene enzymatische Verfahren besitzt, wurden die Konzentrationen der Primär- und Sekundärantikörper durch Verdünnungsreihen erneut ermittelt (siehe Tabelle 4+5). Sehr wichtig bei der Inkubation des Zweitantikörpers war es, direkte längerfristige Lichtexpositionen zu vermeiden, um das vorzeitige Ausbleichen der Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper zu verhindern. Die Inkubation erfolgte deshalb unter Lichtausschluss im Schrank bei Raumtemperatur.

Abhängig von der Kombination der Primärantikörper (Tabelle 4) musste darauf geachtet werden, dass sich diese Antikörper durch lokale Nähe der Antigene im gleichen Subkompartiment nicht behinderten. Wenn die Antikörper gegen ABCD3 und Pex 14p gleichzeitig zusammen auf einen Schnitt aufgebracht wurden, konnte ABCD3 wesentlich schlechter nachgewiesen werden. Aufgründessen wurde der Antikörper gegen ABCD3 eine halbe Stunde vor gleichzeitiger Inkubation mit dem anti-Pex14p aufgetragen. Im Gegensatz zu dem Nachweis zweier Membranproteine (ABCD3 und Pex14p) behinderten sich die Antikörper gegen ABCD3 und gegen peroxisomale Matrixproteine nicht gegenseitig, weshalb diese gleichzeitig aufgetragen werden konnten. Die Primärantikörperreaktion erfolgte über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur (RT). Nach dem Waschen der Präparate erfolgte die gemeinsame Detektionsreaktion mit beiden Sekundärantikörpern für 2 Stunden bei Raumtemperatur. Zur besseren Gewebedarstellung wurden die Zellkerne mit DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) gegengefärbt. DAPI ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der mit den Nukleinsäuren interkaliert und durch fixierte Membranen diffundieren kann. DAPI wird unter dem Fluoreszenzmikroskop mit ultravioletterem Licht angeregt und emittiert bei einer Wellenlänge von ca. 400-500 nm blaues Licht.

### 3.7.3. Einschließen der Präparate

Nach einem kurzen Waschschrift mit aqua dest. wurden die Schnitte mit Mowiol 4-88 (einem mit wäßrigen Lösungen vermischbarem Eindeckmedium) eingedeckt. Als Bleichschutz wurde dem Mowiol 25% (w/v) Propylgallat zugefügt. Um die Schnitte möglichst lange stabil aufbewahren zu können, wurden sie in Objektträgerkästen bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

#### Mowiol

20g Mowiol 4-88  
in 80 ml PBS  
40 ml Glyzerin (reinst)  
(Aufbewahrung bei -20°C)

#### Propylgallat

2, 5 g n-Propylgallat  
in 50 ml PBS  
50 ml Glycerin  
(Aufbewahrung bei  
4°C im Dunkeln)

### 3.7.4. Fluoreszenzmikroskopie

Die Auswertung der fluoreszenzmarkierten Schnitte erfolgte mit einem Leica DMRD-Fluoreszenzmikroskop. Von den meisten Präparaten wurden anschließend noch Aufnahmen am Leica TCS SP2 Laserscanmikroskop gemacht. Hierbei erfolgten die Aufnahmen in der Regel bei der Standardeinstellung „Airy1“. Die Prozessierung der digitalen Bilder wurde mit Photoshop (Version 6) durchgeführt.

Eine Zusammenfassung des Immunfluoreszenzverfahrens ist in Tabelle 9 aufgeführt.



**Tabelle 9: Protokoll für die Immunfluoreszenz an Paraformaldehyd-fixierten Paraffinschnitten**

Die Paraffin-Schnitte wurden zum Abtropfen des meisten Paraffins über Nacht in den Wärmeschrank bei 60C°

<b>IF-Schritt und Behandlung</b>	<b>Verweildauer</b>
<b><u>1.Tag</u></b>	
Entparaffinieren: Xylol I, Xylol II, Xylol III	je 5 min
Rehydrieren: 100%, 100%, 96%, 80%, 70%, 50%, aqua dest. 2x	je 3 min
Proteolyse: 0,01% Trypsin bei 37C° auf Wärmeplatte	10 min
Waschen in PBS3 x	5 min
Citratpuffer pH 6.0 in Mikrowelle höchste Stufe	5 min
Citratpuffer auffüllen	5 min
Aqua dest auffüllen	5 min
Abkühlen lassen	30 min
Waschen in PBS	3 x 5 min
Schnitte mit PAP-Pen umfahren (als Eingrenzungsbarriere)	
Blocken der unspezifischen Proteinbindungsstellen:	
4% BSA in PBS + 0,05% Tween 20	
In feuchter Kammer bei Raumtemperatur	2 h
Waschen in PBS	3 x 5 min
Primärantikörper auftragen	
Verdünnungslösung: 1% PBSA + 0,05% Tween 20	
in feuchter Kammer	über Nacht
<b><u>2.Tag</u></b>	
waschen in PBS, Negativkontrollen separat	3 x 5 min
Sekundärantikörper auftragen	
Verdünnungslösung: 1% PBSA + 0,05% Tween 20	
Inkubation in feuchter Kammer	2 h
waschen in PBS	3 x 5 min
Kernfärbung: DAPI	10 min
Waschen in PBS	3 x 5 min
Aqua dest	5 min
Eindecken mit Mowiol 4-88+ Propylgallat im Verhältnis 3:1	

### **3.8. „Laser-capture Microdissection“**

Die Mikrodissektion ist eine Methode, die es erlaubt Proteine oder RNA aus einem bestimmten Zelltyp, der aus dem Gewebe herausgeschnitten wird, nachzuweisen. Hierbei schneidet man nur die spezifischen Zellen aus dem Gewebe aus, von denen man die RNA gewinnen möchte oder die zum Proteinnachweis in Western Blots verwendet werden sollen.

Von den schockgefrorenen Kopfhälften zwei Tage alter Mäuse wurden 10µm dicke Schnitte mit dem Leica Kryomikrotom CM 3050 angefertigt, und sehr kurz mit Hämatoxylin gefärbt. Dazu wurden die Gefrierschnitte auf RNase freie Objektträger aufgezogen, die mit einer dünnen Spezialmembran überzogen waren.

Die Objektträger wurden mit dem gefärbten Gewebe unter das Mikroskop des P.A.L.M. Laser-Microdissektion-Systems gelegt. Mit dem 40x Trocken-Objektiv wurde die Region der spezifischen Zellen eingestellt, die später ausgeschnitten werden sollten. Die ausgeschnittenen Gewebestücke auf der Spezialmembran der Objektträger wurden in den Deckel eines Eppendorf-Gefäßes (1,5ml) katapultiert. 60-80 Zellen wurden jeweils gesammelt und in dem Röhrchen direkt mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde aus dem gesammelten Gewebematerial Gesamt-RNA isoliert.

### **3.9. RNA-Isolierung**

Um die Primer für die RT-PCR auszutesten wurde die Gesamt-RNA aus dem präparierten Kiefer neugeborener Mäuse isoliert. Hiefür wurde das RNeasy®Lipid Tissue Mini Kit (50) der Firma Qiagen eingesetzt. Das Protokoll wurde direkt von dem entsprechenden Handbuch der Firma übernommen (<http://www1.qiagen.com>). Die Bestimmung der RNA-Menge erfolgte über OD-Messungen im Photometer, wobei OD = 1 40µg Gesamt-RNA entsprechen. Die Konzentration der eingesetzten RNA ließ sich mit der folgenden Formel berechnen:

$\text{Konzentration C} = \text{OD - Wert} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Multiplikationsfaktor}$
---

#### **3.9.1. Nachweis spezifischer mRNAs über RT-PCR**

Mittels einer RT-PCR kann man die spezifische Expression unterschiedlicher mRNAs in Zellen semiquantitativ nachweisen. Dazu wird ein Gemisch aus cDNA mit Hilfe von oligo-dT-Primern und des Enzyms Reverse Transkriptase (RT) nach Isolierung der Gesamt-RNA hergestellt. Anschließend erfolgt der Nachweis eines spezifischen Gens durch PCR (Polymerase Chain Reaction) mit spezifischen Primern. Die PCR Produkte werden über

Agarose-Gel-Elektrophorese aufgetrennt und beurteilt. Um eine Bezugsgröße zu der zu quantifizierenden RNA zu haben, verwendet man den Nachweis sogenannter House-Keeping-Gene, die sich in verschiedenen Geweben möglichst wenig in ihrer Expression unterscheiden. Die ribosomale RNA (rRNA) macht ungefähr 80% der Gesamt-RNA aus. Aufgrund dieser hohen Prozentzahl an der Gesamt-RNA geht man davon aus, dass die Menge der ribosomalen RNA nur sehr geringe Schwankungen aufweist. Deshalb ist die Bestimmung der Expressionsmenge der 28srRNA eine gute Positivkontrolle, die auch von mir zur semiquantitativen Analyse der Expressionsmuster verwendet wurde.

### **3.9.2. Herstellung der cDNA**

Aus der isolierten Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des SuperScript II RT-Kit eine einzelsträngige cDNA hergestellt. Bei deren Herstellung richtete ich mich genau nach der Anleitung von der Firma Invitrogen. Die Komponenten dafür wurden einzeln von Invitrogen bestellt (<http://www.biocompare.com>).

### **3.9.3. RT-PCR**

Die spezifischen Primer wurden mit dem Primer3-Programm ausgewählt und anschließend mit dem Blast-Programm auf eventuelle ähnliche Sequenzen in einer „Expressed sequence target“ (EST)-Datenbank der Maus überprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Das Protokoll für die RT-PCR wurde bei uns im Labor etabliert und als Standardprotokoll benutzt (Nenicu et al 2007). Alle Primer wurden mittels Gradienten PCR auf die beste Annealing-Temperatur ausgetestet.

Die PCR wurde im i-Cycler (BioRad) mit folgender Reaktionszusammensetzung durchgeführt:

#### **PCR-Ansatz (25µl):**

1 µl cDNA  
2,5 µl PCR-Puffer  
0,2 µl 10 mM dNTPs  
1 µl Vorwärts-Primer  
1 µl Rückwärts-Primer  
0,2 µl TaqDNApolymerase  
19,1 µl steriles Wasser

Alle Ansätze wurden bis auf die Taq-Polymerase zusammen pipettiert. Anschließend wurden die Primer hinzugegeben. Nach dem Zufügen der Taq-Polymerase erfolgte die PCR-Reaktion unter den folgenden Bedingungen:

Denaturierung 95°C 30 s	} 35 Zyklen
Annealing (Primer Anheftung) 64°C 45 s	
Elongation (Kettenverlängerung) 72°C 1 min	

Danach erfolgte eine 3 min Kettenverlängerung bei 72°C.

Nach Abschluss der Reaktion wurde automatisch auf 4°C gekühlt und zeitnah die PCR-Proben bei -20°C eingefroren.

Die PCR-Reaktionen wurden auf spezifische Amplifikationsprodukte in Agarosegelen überprüft. Die Gele wurden wie folgt hergestellt: 2,5%tige Agarose wurde in 40ml TAE-Puffer in der Mikrowelle bis zur Auflösung aufgeköcht. Nach dem Abkühlen wurden 0,5 µl Ethidiumbromid dazugegeben und in das Gelgemisch in der Gelkammer gegossen.

**TAE-Puffer (10x):**

108 g Tris

57,1 ml Eisessig

- 100 ml 0,5 M EDTA
- H<sub>2</sub>O ad 1 l

pH 8,0

## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Auswahl der Mausentwicklungsstadien für die Kopfpräparate und deren morphologische Strukturerhaltung**

Die Wahl der Zahnstadien erfolgte nach intensivem Literaturstudium über einen Vergleich mit der Publikation von Ruch (siehe Tabelle 2, Ruch 1987), damit alle kompletten Zahnstadien - von der Knospe bis zum ausdifferenzierten Zahn - für die Untersuchungen zur Verfügung standen.

#### **4.1.1. Morphologische Strukturerhaltung der Kopfpräparate**

Die angewandte Perfusionsfixierung mit dem 4% PFA-Fixans erwies sich als optimal für die Zahngewebe. In allen Entwicklungsstadien der Mäuse wurde mit diesem Fixans eine sehr gute allgemeine histologische Strukturerhaltung erzielt. Weiterhin wurde eine optimale Zahnerhaltung mit gut geschlossenen Amelo- und Odontoblastenreihen erreicht.

Durch die automatisierte Paraffineinbettung konnte die Gewebepenetration in den Kopfpräparaten so optimiert werden, dass trotz unterschiedlicher Gewebearten mit verschiedenen Dichten gute Schnitte aller Maus-Entwicklungsstadien ohne Rissartefakte hergestellt werden konnten. Die Schnittdicke konnte sogar bis auf 1-2  $\mu\text{m}$  minimiert werden, was eine hochauflösende lichtmikroskopische Analyse ohne große Hintergrundfluoreszenz und die optimale Auflösung zwischen unterschiedlichen Organellen erst ermöglichte.

Hämatoxylin/Eosin (HE)- und immunhistochemisch gefärbte Schnitte wurden analysiert, um eine Übersicht über die Entwicklungsstufen der Zähne zu erhalten. Die genaue Analyse aller eingebetteten Zahnpräparate ergab, dass sich verschiedene Molaren in einem Kiefer des gleichen Tieres in unterschiedlichen Entwicklungsstadien befanden. Deshalb wurde bei den Untersuchungen im Regelfall der 2. Molar verwendet. Bei Nagetieren haben die vergrößerten Schneidezähne (Nagezähne) einen unterschiedlichen Aufbau im Vergleich zum Menschen, weshalb diese nicht für unsere Untersuchungen herangezogen wurden. Bei genauer Analyse der Molaren konnten bei 1-3 Tage alten Mäusen alle verschiedenen Differenzierungsstadien der spezifischen Zellen der Zahngewebe (Ameloblasten und Odontoblasten) nachgewiesen werden.

## **4.2. Etablierung der Methode zum optimalen Peroxisomennachweis in Zahngeweben verschiedener Entwicklungsstadien**

Ein im Labor bereits etabliertes Immunhistochemie(IHC)-Protokoll zum Nachweis peroxisomaler Proteine an Paraformaldehyd-fixierten Schnitten wurde für die Nachweisreaktion peroxisomaler Antigene in Zahngeweben angepasst.

### **4.2.1. Vorbehandlung und Antigenwiederherstellung an Paraffinschnitten**

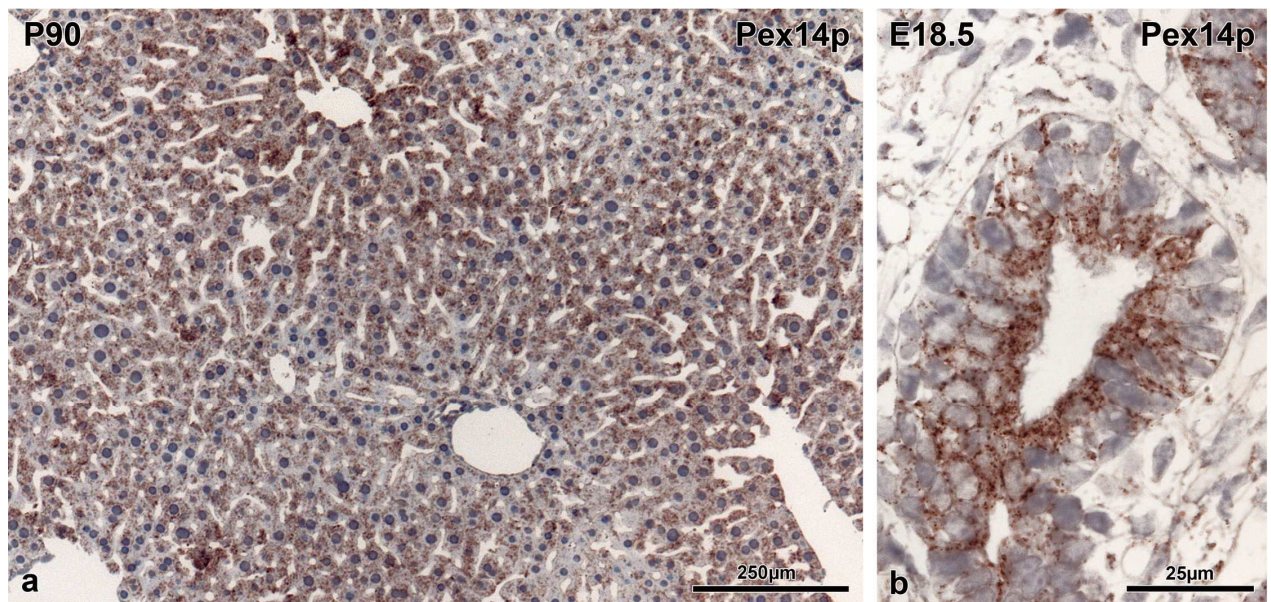
Ohne enzymatischen Andau der Zahngewebe mit Trypsin konnten keine peroxisomalen Proteine in den Paraffinschnitten nachgewiesen werden. Da der Zahn sowohl harte als auch weiche Gewebe besitzt, wurden Präparate mit unterschiedlichen Trypsinandauzeiten miteinander verglichen. Bei Paraffinpräparaten von 3-4 µm wurden 15 Minuten als optimale Andauzeit bestimmt. Mit diesen Präparaten konnten jedoch keine scharfen mikroskopischen Bilder der Zähne in höheren Vergrößerungen aufgenommen werden. Deshalb wurde die Schnittdicke minimiert. Der Nachteil zu dünner Schnitte war jedoch, dass unterschiedliche Gewebe der Zähne sehr leicht an Grenzstellen einrissen. Mit längerer Übung und Verwendung der richtigen Blocktemperatur ließen sich aber auch vollständige Zahnanlagen dünn schneiden. Bei geringer Dicke (1-2µm) musste entsprechend die Trypsinandauzeit verringert werden. Bei längeren Andauzeiten kam es zum Überverdau der Zellkerne und zum Herauslösen der DNA, was die anschließende Immunreaktion stark abschwächte und die Gewebeerhaltung stark verschlechterte. Zur Verbesserung der Schnittpenetration wurde eine Membranpermeabilisierung mit 0,1% Tritonlösung nach dem Trypsinverdau ausgetestet, was jedoch auch zum Austritt der DNA aus den Zellkernen führte. Deshalb wurde diese Methode nicht weiter eingesetzt. Als optimale Vorbehandlung erwies sich die Kombination aus 10minTrypsinverdau (0,01%) mit anschließender Mikrowellenbehandlung (siehe Tab.8).

### **4.2.2. Einsatz von NovaRed als Farbsubstrat für die Meerrettich-Peroxidase**

Zur Visualisierung der Peroxisomen mittels Nachweis über enzymatische Peroxidasereaktion spielte die Entwicklungszeit zur Präzipitation von NovaRed in den Schnitten eine große Rolle. Zu kurze Entwicklungszeiten (2-4min), die jedoch in parallel inkubierten Präparaten mit Leber- oder Darmgeweben gute Ergebnisse erzielten, erbrachten in den Zahngeweben keine positiven Resultate. Es fiel auf, dass 1:2 verdünnte NovaRed Lösung und längere Entwicklungszeiten bessere Resultate lieferten als konzentrierte Lösung und kürzere Entwicklungszeiten. Deshalb wurden die Inkubationszeiten, im Vergleich zur Beschreibung der Firma verlängert. Durch eine Reihe von verschiedenen Entwicklungszeiten konnten 7

Minuten als optimale Zeit zur Darstellung individueller Peroxisomen in Zahngeweben (d.h. punktförmige Färbung) ermittelt werden. Bei längerer Peroxidasereaktion (>8min) trat vermehrt unspezifische Hintergrundfärbung im Zytoplasma auf, die die Darstellung einzelner Zellorganellen in Zahngeweben verschleierte oder unmöglich machte, weshalb die Färbezeiten immer korrekt eingehalten werden mussten.

Als Referenzgewebe (Positivkontrolle) zur Standardisierung und Optimierung diente in allen folgenden Experimenten mit Zahnpräparaten separate Paraffinblöcke von Lebergewebe erwachsener Mäuse und parallel dazu Ausführungsgänge der Speicheldrüsen im Kopfbereich der jeweiligen Foetenpräparate (Abb.7).



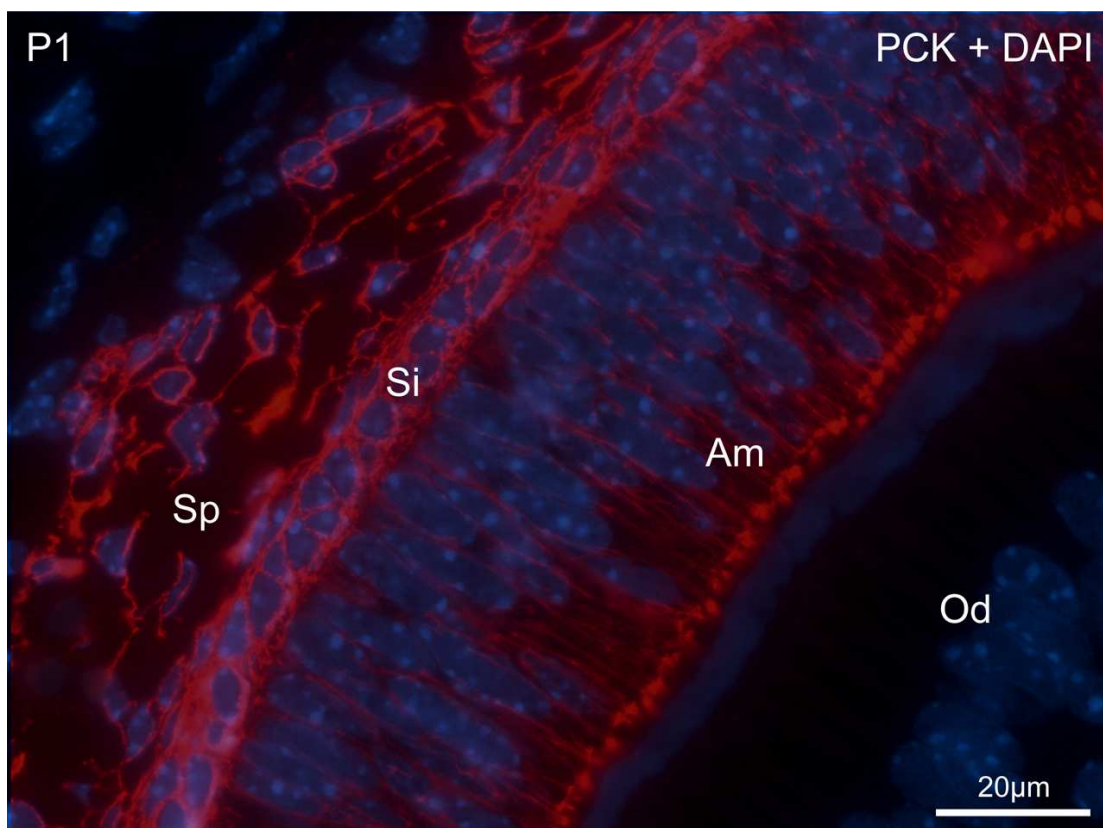
**Abb.7: Immunhistochemische Positivkontrollen von Peroxisomen in Leber und Speicheldrüsen.** Vergleichende Analyse der Peroxisomenverteilung in der Leber und den Ausführungsgängen der Speicheldrüsen durch immunhistochemische Lokalisation von Pex14p mittels der ABC-Peroxidase-Methode. a) Übersichtsaufnahme eines Leberazinus, b) Ausführungsgang der Mundspeicheldrüse (Parotis). Die Länge der Maßstäbe entspricht in (a) 250 µm und in (b) 25 µm.

Bei optimaler Markierung war in der Leber ein Gradient der Peroxisomenanzahl bei adulten weiblichen Mäusen nachzuweisen (Abb.7a). Außerdem konnten alle Organellen, wie z.B. auch in Speicheldrüsenausführungsgänge, als deutliche Punkte lokalisiert werden und die diffuse Hintergrundreaktion war unter optimalen Bedingungen nur sehr gering ausgeprägt (Abb.7b).



#### 4.2.3. Immunfluoreszenz kombiniert mit Laserscanning-Mikroskopie führen zur hohen Sensitivität und optimalen Darstellung von Zellbestandteilen

Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung sehr kleiner Objekte mit 100-250 nm Durchmesser, erbrachte die Fluoreszenzmikroskopie entschiedene Vorteile, besonders in Verbindung mit konfokaler Laserscanning-Mikroskopie, weil die Organellen durch Lichtemission scheinbar vergrößert wurden. Deshalb konnten mit dieser Methode gerade kleine Organellen (auch unter 10nm), wie sie im Zahngewebe vorkommen, noch dargestellt werden, die mit ABC-Technik und regulärer Lichtmikroskopie nicht erkannt wurden. Ein weiterer Vorteil dieser Methode war die fehlende unspezifische zytoplasmatische Hintergrundfärbung, die beim enzymatischen immunhistochemischen Nachweis in geringen Mengen immer vorhanden war und durch Diffusion während der Enzymreaktion bei der Farbstoffpräzipitation entstand. Durch Verwendung von Alexa-Fluor-oder Texas-Rot-gekoppelten Antikörpern wurden starke Fluoreszenzsignale in den Immunpräparaten erreicht, die sehr photostabil waren und nicht ausbleichen (Abb.8).



**Abb.8: Doppelfluoreszenz für Maus-anti-Pancytokeratin (PCK26-Antikörper: Esel anti-Maus TexasRed Nachweis) und DAPI zur Kerngegenfärbung.** Durch die dünne Schnittdicke und optimale Immunreaktion werden die Cytokeratinfilamente in Ameloblasten (Am) im Stratum Intermedium (Si) und in der Schmelzpulpa (Sp)eindeutig dargestellt. Die Abbildung verdeutlicht weiterhin die hohe Spezifität der Immunreaktion, da weder in der benachbarten Hartsubstanz (Prädentin) noch in den Odontoblasten (Od) Kreuzreaktionen auftreten. PCK=Pancytokeratin. Der Maßstab entspricht 20µm.



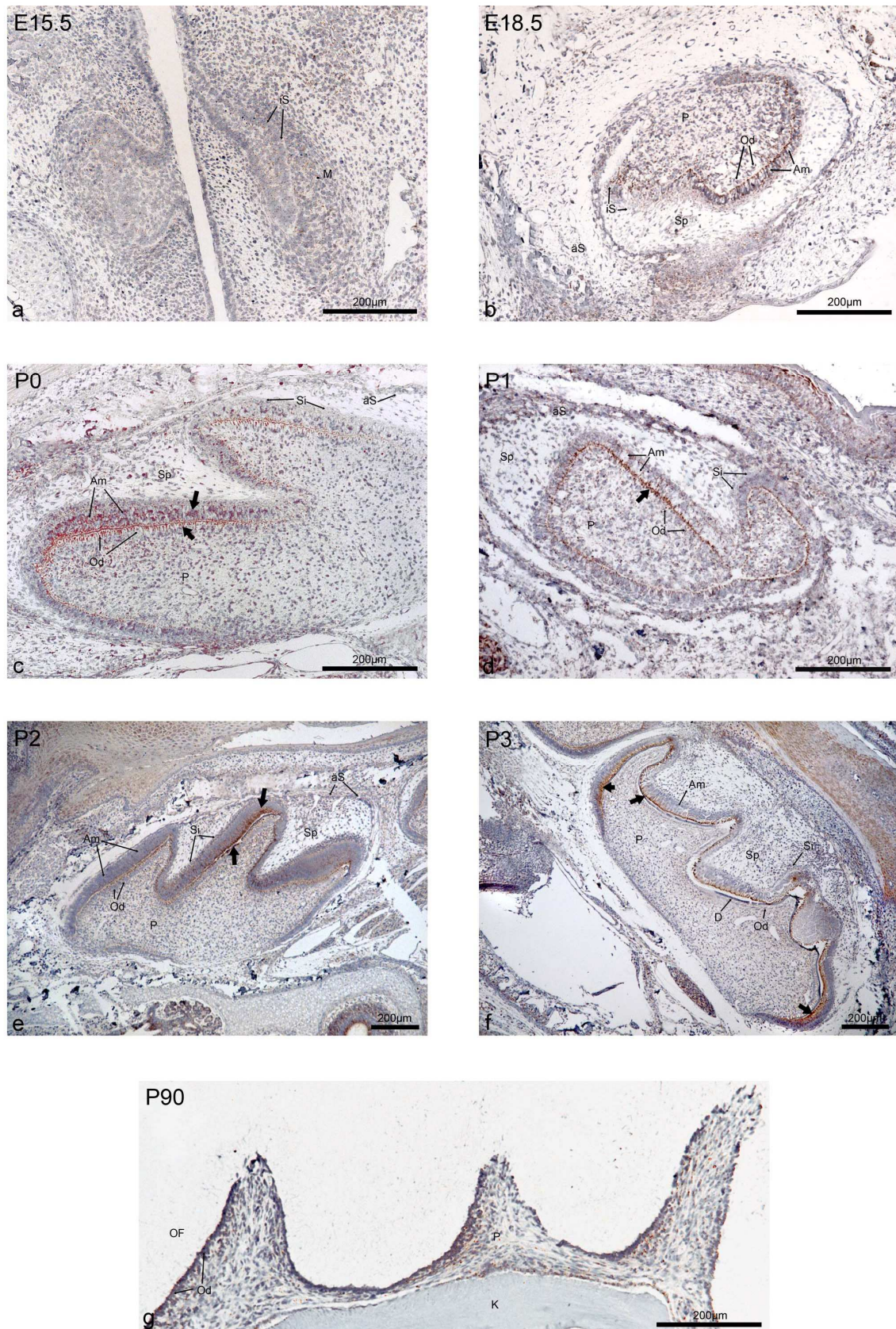
Die Reduzierung der Schichtdicke auf möglichst dünne Präparate ermöglichte erst die optimale Darstellung von Zellbestandteilen (z.B. Cytoskelettelemente, Peroxisomen oder Mitochondrien) ohne starke Hintergrundfluoreszenzen durch Streulicht von Organellen aus anderen Schnittebenen (Abb.8). Die Reduzierung verbesserte weiterhin auch entscheidend die Darstellung der Organellen durch Laser-Scan-Mikroskopie (siehe hierzu fluoreszenzmikroskopische Abbildungen 15, 17 und 20).

#### **4.3. Nachweis der Peroxisomen in Zahngeweben der unterschiedlichen Entwicklungsstadien**

Nachdem die methodischen Voraussetzungen geschaffen waren, wurden die Peroxisomen in den unterschiedlichen Zahngeweben mittels verschiedenen Antikörpern nachgewiesen.

##### **4.3.1. Peroxisomenvorkommen in verschiedenen Zahngeweben unterschiedlicher Entwicklungsstadien**

Übersichtsaufnahmen konnten von Immunfluoreszenzpräparaten nur mit Zellkernfärbung fotografiert werden, weil die peroxisomale Markierung bei niedriger Vergrößerung nicht von der Hintergrundfluoreszenz zu unterscheiden war. Deshalb sind ab Kapitel 4.3.2. alle Immunfluoreszenzpräparate von Organellen nur in höheren Vergrößerungen fotografisch dargestellt. Im Gegensatz zur Immunfluoreszenz war die Peroxisomenfärbung in immunhistochemischen Präparaten mit der ABC-Peroxidase-Methode durch die Farbstoffpräzipitation auch in niedrigen Vergrößerungen in Bereichen mit hoher Peroxisomendichte deutlich zu erkennen, weswegen die abgebildeten Übersichten nur mit dieser Methode dargestellt wurden. In den immunhistochemischen Färbungen der verschiedenen Entwicklungsstadien der Zähne (E15.5-P3, P90) wurde deutlich, dass das peroxisomale Biogeneseprotein Pex14p, das beste Markerprotein zum Nachweis der Peroxisomen im Zahngewebe darstellte (Abb.9 und 10). Deshalb werden alle nachfolgenden Übersichtsfärbungen mit diesem Marker dargestellt. Die nachfolgende Abbildung (Abb.9) gibt eine Übersicht mit niedrigen Vergrößerungen der Peroxisomenlokalisation unterschiedlichen Zahnstadien, gefärbt durch Immunhistochemie mit Kaninchen anti-Pex14p-Antikörper, während Abb.10 die entsprechenden höheren Detailaufnahmen darstellt. Dieser Antikörper erbrachte die besten Markierungsergebnisse jeglicher Peroxisomen in allen unterschiedlichen Zahnstadien. Selbst in ganz frühen Entwicklungsstadien ließen sich damit eindeutig Peroxisomen nachweisen. Somit ist Pex14p als ubiquitärer Marker zur



**Abb.9: niedrige Übersichtsvergrößerungen der immunhistochemischen Lokalisation von Pex14p in Paraffinschnitten unterschiedlicher Entwicklungsstadien (E15.5-P90) des 2. Molaren.** Am=Ameloblasten, äS=äußeres, D=Dentin, iS=inneres Schmelzepithel, K=Knochen, M=Mesenchym, Od=Odontoblasten, OF=Odontoblasten-Fortsätze, P=Pulpa, Si=Stratum intermedium, Sp=Schmelzpulpa, → =Peroxisomen. Die Länge der Maßstäbe entspricht 200µm.

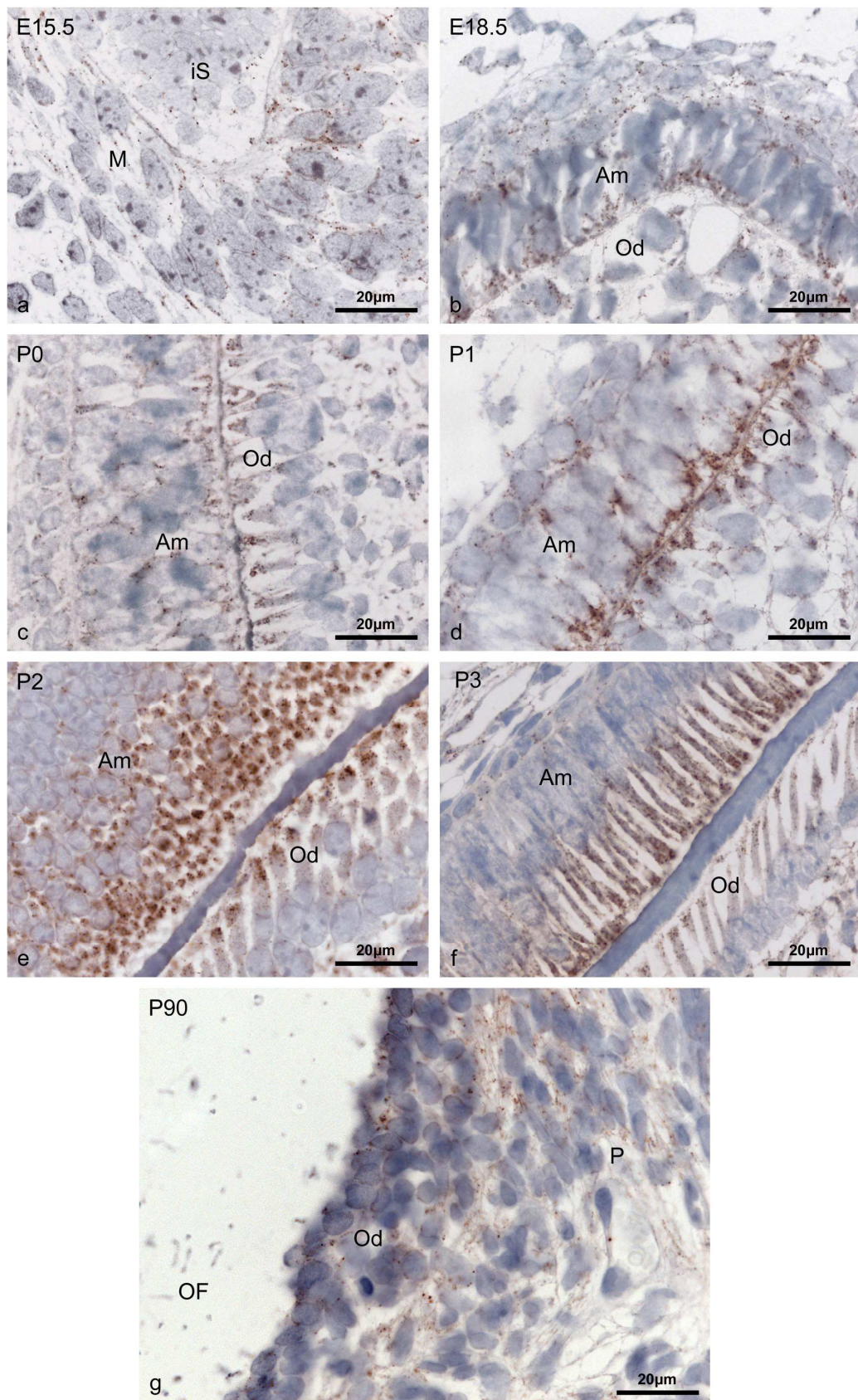
Peroxisomenlokalisation geeignet mit dem auch die genaue Anzahl dieser Zellorganellen nachgewiesen werden kann.

Die Übersichtsfärbungen für Pex14p erbrachten, dass Peroxisomen in allen Zahngeweben und Entwicklungsstufen vorhanden sind. Während in niedrigen Vergrößerungen im E15.5 Entwicklungsstadium nur wenig Organellen in Epithelzellen des inneren Schmelzepithels und in Ausläufern bereits induzierter Mesenchymzellen sichtbar waren (Abb.9a, 10a), konnten diese Organellen mit zunehmender Differenzierung der Zahngewebe in weiter fortgeschrittenen Entwicklungsstadien deutlich nachgewiesen werden (9b-f, 10b-f). Die Ansammlung der Peroxisomen in den hartsubstanznahen Anteilen der Ameloblasten war am deutlichsten zu erkennen. Im Vergleich zu anderen Geweben epithelialer Herkunft (z.B. Leber, Mundspeicheldrüsen) war jedoch die Anzahl dieser Organellen in allen verschiedenen Zelltypen des Zahnes geringer (vergl. Abb.9 mit Abb.7a oder Abb.10 mit Abb.7b).

In höheren Vergrößerungen der am weitesten ausdifferenzierten Ameloblasten- und Odontoblastenareale der verschiedenen Entwicklungsstufen (P2, P3) (Abb.9e+f, 10e+f) war eine Peroxisomendichtenzunahme eindeutig nachzuweisen. Im Vergleich zum inneren Schmelzepithel des Knospenstadiums (15.5) (Abb.9a) waren die Peroxisomen nach dessen Differenzierung in Ameloblasten des Kappenstadiums (E18.5) in höherer numerischer Dichte (d.h. vermehrt) vorhanden (Abb.9b+10b). Die anliegenden frühen Odontoblasten mit noch fehlender Polarisierung enthielten dagegen nur wenige Peroxisomen (Abb.9b+10b). Im Rahmen der Polarisierung vermehrten sich die Zellorganellen und wanderten in den apikalen Fortsatz (P1) (Abb.9d+10d). In den ausdifferenzierten Odontoblasten waren zum Zeitpunkt der beginnenden Dentinsynthese (P2) die meisten Peroxisomen im apikalen Fortsatz enthalten (Abb.9e+10e). Bei fortschreitender Dentinbildung nahm die Organellenanzahl wieder ab (P3) (Abb.9f+10f). Im ausgewachsenen Zahn (P90) war die Peroxisomendichte insgesamt in den Odontoblasten geringer, jedoch das peroxisomale Kompartiment im Vergleich zu den benachbarten Fibroblasten der Pulpa immer noch stärker ausgeprägt (Abb.9g).

Ähnlich wie in unterschiedlichen Altersstadien der Tiere, zeigten die verschiedenen Differenzierungsstadien eines Gewebetypes (z.B. Präameloblasten → sekretorische Ameloblasten) innerhalb des gleichen Zahns signifikante Unterschiede in der Peroxisomenanzahl (siehe Kapitel 4.3.2.). In unterschiedlichen Zahnstadien (E15.5-P3) waren außer der numerischen Peroxisomendichtenzunahme auch starke Differenzen in der Ausprägung und vorhandenen Mengen der verschiedenen peroxisomalen Proteine im





**Abb.10: Detailaufnahmen der immunhistochemischen Lokalisation von Pex14p in Paraffinschnitten unterschiedlicher Entwicklungsstadien des 2. Molaren.** Deutliche Variation der numerischen Dichte der Peroxisomen in den verschiedenen Zellen in den unterschiedlichen Zahnentwicklungsstadien. Am=Ameloblasten, M=Mesenchym, iS=inneres Schmelzepithel, Od=Odontoblasten, OF=Odontoblasten-Fortsätze, P=Pulpa. Die Länge der Maßstäbe entspricht 20µm.

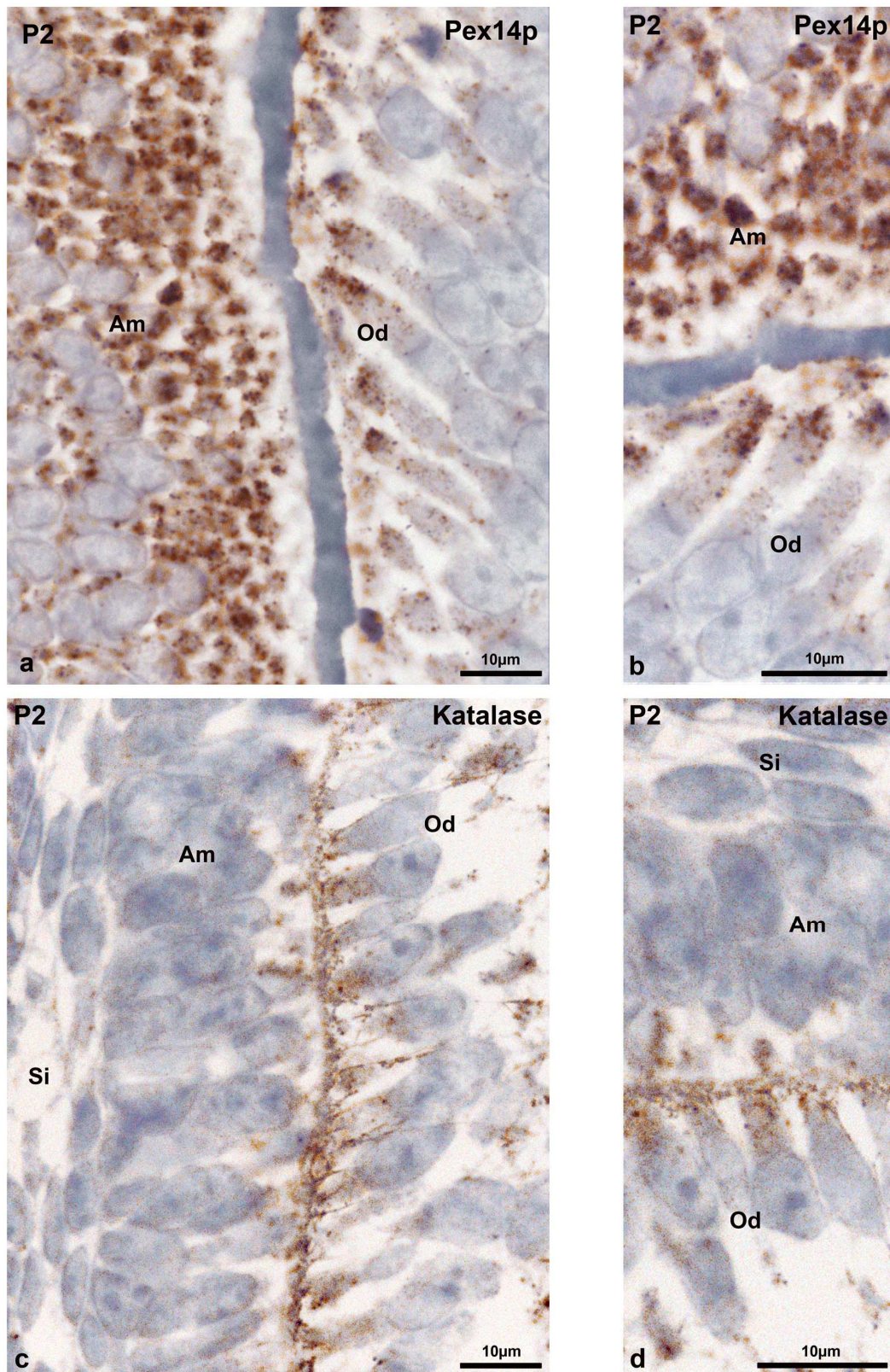
Vergleich zur Pex14p-Markierung vorhanden (siehe Kapitel 4.3.4.). Deshalb wurden alle vorhergehenden Übersichtsfärbungen mit diesem Marker durchgeführt.

Im Vergleich zu Pex14p (Abb.11a,b), waren Peroxisomen mit anti-Katalase-Antikörpern (Abb.11c,d) in immunhistochemischen Präparaten verschiedener Entwicklungsstadien wesentlich schlechter nachweisbar, während andere Gewebe im Foetus, z.B. die Speichelausführungsgänge, wesentlich mehr Katalase enthielten. Abb. 11 veranschaulicht deutlich den Unterschied in der Lokalisation der Peroxisomen durch den anti-Katalase-Antikörper im Gegensatz zu anti-Pex14p-Antikörper im 2. Molaren einer 2 Tage alten Maus. Alle Fortsätze der Ameloblasten wiesen, im Gegensatz zu denen, die mit dem anti-Katalase-Antikörper markiert worden waren (Abb.11c,d), eine starke Immunreaktion in Peroxisomen in Färbungen mit anti-Pex14p-Antikörper auf (Abb.11a b). Ameloblasten schienen fast keine Katalase in den Peroxisomen zu enthalten, während die Fortsätze der Odontoblasten jedoch deutliche Markierungen dieser Organellen mit dem Katalaseantikörper zeigten. Im Gegensatz hierzu markierte der Pex14p-Antikörper die Organellen in beiden Zelltypen. Interessanterweise werden in der Literatur jedoch hauptsächlich anti-Katalase-Antikörper zur Markierung für Peroxisomen in verschiedenen Gewebetypen eingesetzt. In Zahngeweben scheinen jedoch alle peroxisomalen Membranproteine im Vergleich zur Katalase vermehrt vorhanden zu sein (siehe Tabelle 10) und eignen sich deshalb besser zur Darstellung der Organellen in diesen Zelltypen.

Die kompletten Ergebnisse zur Verteilung aller peroxisomalen Markerproteine (Pex14p, Pex13p, Katalase, Acyl-CoA-Oxidase, ABCD3 und alle SKL-haltigen peroxisomalen Matrixproteine) in unterschiedlichen Zahnentwicklungsstadien sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

Je nachdem welcher Antikörper zur Darstellung verschiedener peroxisomalen Proteine eingesetzt wurde, zeigte sich nicht nur eine unterschiedliche Häufigkeit, sondern auch eine andere Größe der Peroxisomen, was durch die verschiedenen Expressionsmengen der spezifischen Markerproteine erklärt werden kann. Signifikant auffällig waren auch hierbei die starken Unterschiede in der Expression der verschiedenen Markerproteine sowie der Peroxisomenverteilung in den jeweiligen Färbungen in verschiedenen Zahnstadien (E15.5-P90). Vergleichbar mit Pex14p wiesen alle anderen peroxisomalen Proteine eine unterschiedliche Verteilung in Zahnknospe, Zahnglocke, Differenzierungsstadium und ausdifferenziertem Zahn auf.





**Abb. 11: Veranschaulichung der unterschiedlich starken Peroxisomen-Markierungen im Zahn des späten Glockenstadiums mittels Pex14p und Katalase. Am = Ameloblasten, Od=Odontoblasten, Si=Stratum intermedium. Die Länge der Maßstäbe entspricht 10µm.**

**Tabelle 10: Übersicht der Detektion verschiedener peroxisomalen Proteine in den unterschiedlichen Stadien der Zahnentwicklung**

Zahnstadium	Pex14p	Pex13p	ABCD3	Katalase	-, „SKL“	AcoxI 55kDa	AcoxI 21,5kDa
<b>Zahnknospe</b>	+++	+++	+++	+++	++	++	++
<b>Kappenstadium</b>	+++	+++	+++	+++	++	++	++
<b>Frühes Glockenstadium (Differenzierungsstadium)</b>	+++	+++	+++	Od.+++ Str.i.+++ Am++ P.+/-	++	++	++
<b>Spätes Glockenstadium (Sekretionsstadium)</b>	++++	+++	+++	Od.+++ Str.i.+++ Am+ P.+/-	+++	+++	+++
<b>Ausdifferenzierter Zahn, in der Mundhöhle (ohne Ameloblasten)</b>	Od.+++ P.+++	Od.+++ P.+++	Od.+++ P.+++	Od.+++ P.+++	Od.+ P.+	Od.+ P.+	Od.+ P.+

+	sehr viel	+ groß
+++	viel	+ mittel
++	wenig	+ klein
+	sehr wenig	
+/-	nicht genau identifizierbar	
<b>Od</b>	Odontoblasten	
<b>P</b>	Pulpa	
<b>Si</b>	Stratum intermedium	
<b>Am</b>	Ameloblasten	

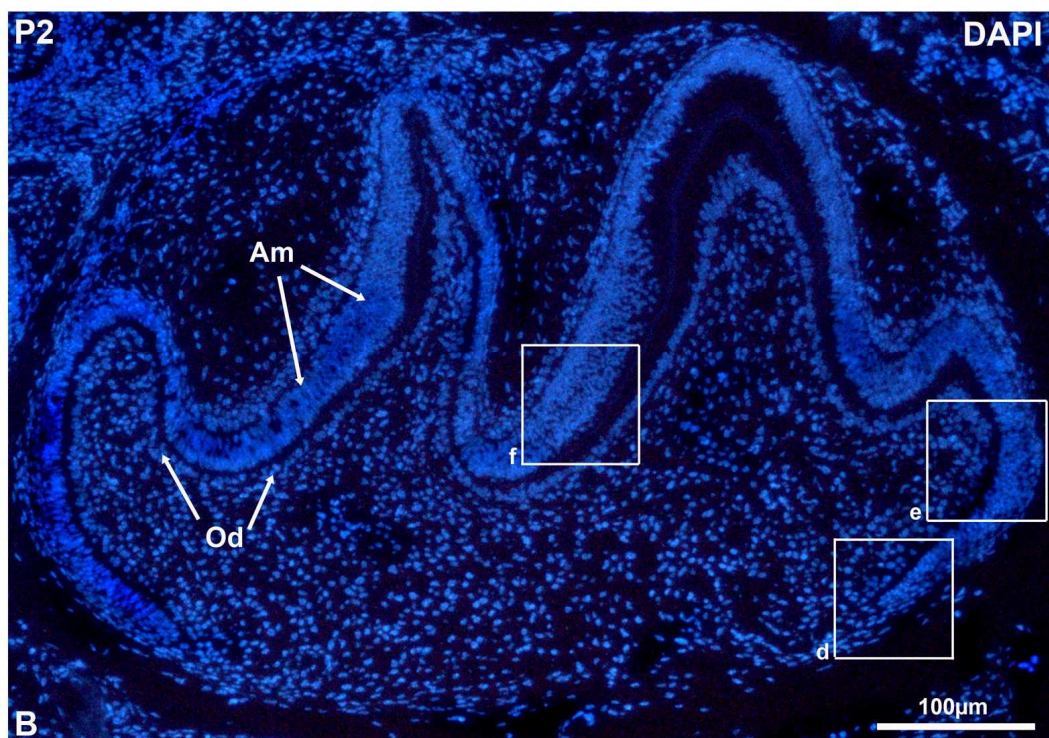
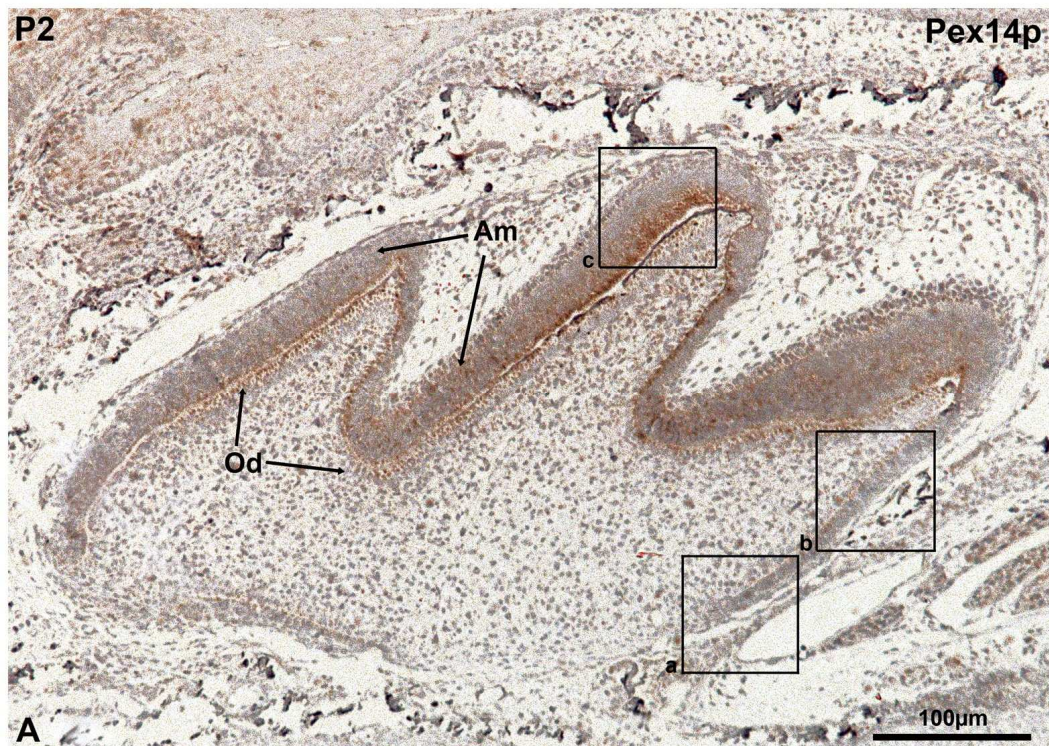
(wenn kein spezifischer Zelltyp erwähnt ist, bezieht sich die Menge auf alle Zelltypen)

#### 4.3.2. Unterschiede des Peroxisomenvorkommens in Abhängigkeit vom Zelldifferenzierungsstadium des gleichen Zahnes

Alle drei möglichen Phasen in der Differenzierung und Maturierung der Ameloblasten und Odontoblasten sind erst ab dem späten Glockenstadium (P2) in Zähnen vorhanden. Deshalb wurden Übersichtsaufnahmen der Molaren 2 bis 3 Tage alter Mäuse verwendet, um einen Einblick in die Unterschiede zwischen den Differenzierungsgraden der verschiedenen Zelltypen am gleichen Zahn zu demonstrieren. Da der Antikörper gegen Pex14p die zuverlässigsten und besten Färbungen der Peroxisomen in unterschiedlichen Entwicklungsstadien ermöglichte, wurde dieser auch zur Darstellung der Organellenverteilung des gleichen Zahnes im späten Glockenstadium verwendet. Ähnlich wie in unterschiedlichen Entwicklungsstadien (E15.5-P3) waren die starken Unterschiede in der Verteilung und der numerischen Dichte der Peroxisomen in verschiedenen Phasen der Zelldifferenzierung von Amelo- und Odontoblasten der Molaren im späten Glockenstadium (P2) mit beginnender Mineralisierung vorhanden (Abb. 12). In diesem Stadium lassen sich drei Zonen verschiedener Reifungsgrade der Ameloblasten und der Odontoblasten unterscheiden. In der Anfangsphase (Phase 1) sind Präameloblasten und Präodontoblasten vorhanden (Abb. 12A-a und 12B-d). In diesem Stadium waren die Peroxisomen in beiden Zelltypen gleichmäßig verteilt. In der Differenzierungsphase (Phase 2) beginnen die Zellen sich langsam zu differenzieren (Abb. 12A-b und 12B-e). Die Anzahl der Peroxisomen nahm in beiden Zelltypen der Phase 2 allmählich zu. Sobald die ausgereiften Ameloblasten und Odontoblasten in die Sekretionsphase (Phase 3) übergingen (Abb. 12A-c und 12B-f) fand sich eine höhere Peroxisomendichte, vor allem auch in den zur apikalen Seite gerichteten Fortsätzen beider Zelltypen. Am deutlichsten war dieses intrazelluläre Verteilungsmuster der Peroxisomen in Ameloblasten zu erkennen. Ähnlich wie die Präameloblasten/-Präodontoblasten und im Gegensatz zu den Schmelz- und Dentin-sezernierenden Amelo-/bzw. Odontoblasten, zeigten alle Zellen sowohl in der Pulpa als auch in der Schmelzpulpa eine zufällige, gleichmäßige intrazelluläre Verteilung der Peroxisomen.

Die Tabelle 11 gibt eine Übersicht über die Verteilung der Organellen, deren Häufigkeit und scheinbare Größe (d.h. der Stärke der Immunreaktion) in den Ausdifferenzierungsphasen aller Zelltypen der Zahngewebe in den unterschiedlichen Präparaten zur Lokalisation verschiedener peroxisomaler Proteine.





**Abb.12: Übersichtsaufnahmen von 2. Molaren einer 2 Tage alten Maus im Glockenstadium.**  
A) Übersichtsaufnahme eines Immunhistochemiepräparates mit der ABC-Peroxidase-Methode (IHC) unter Verwendung des anti-Pex14p-Antikörpers. a, b, c sind Ausschnitte die in Abb. 12 vergrößert dargestellt werden. B) Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme der Zellkernverteilung (DAPI-Färbung und UV-Filter) eines Immunfluoreszenz (IF)-Präparates zur Lokalisation von Pex14p. d,e,f sind Ausschnitte, die in Abb. 13 vergrößert dargestellt werden. Am=Ameloblasten, Od=Odontoblasten. Die Länge der Maßstäbe entspricht 100µm.

**Tabelle 11: Übersicht über peroxisomale Proteine abhängig von den Differenzierungsphasen der spezifischen Zellen in verschiedenen Zahngeweben des späten Glockenstadiums**

Phase 1	Ameloblasten	Odontoblasten	Pulpa	Schmelzpulpa	Str.intermedium
Pex14p	++	++	++	++	*
Pex13p	++	++	++	++	*
ABCD3	++	++	++	++	*
AcoxI - 21,5 kDa	++	++	++	++	*
AcoxI - 53 kDa	++	++	++	++	*
SKL	++	++	++	++	*
Katalase	++	++	++	++	*
Phase 2					
Pex14p	++	++	++	++	++
Pex13p	++	++	++	++	++
ABCD3	++	++	++	++	++
AcoxI - 21,5 kDa	++	++	++	++	++
AcoxI - 53 kDa	++	++	++	++	++
SKL	++	++	++	++	++
Katalase	+	+	+	+	+
Phase 3					
Pex14p	+++	+++	+++	+++	+++
Pex13p	++	++	++	++	++
ABCD3	+++	+++	+++	+++	+++
AcoxI - 21,5 kDa	++	++	++	++	++
AcoxI - 53 kDa	++	++	++	++	++
SKL	++	++	++	++	++
Katalase	+	+++	+++	++	+++

**Phase 1** = Präameloblasten/Präodontoblasten

+++ stark detektierbar

⊕ groß

**Phase 2** = Differenzierungsphase

++ detektierbar

⊕ mittel

**Phase 3** = Sekretionsphase

+ kaum detektierbar

⊕ klein

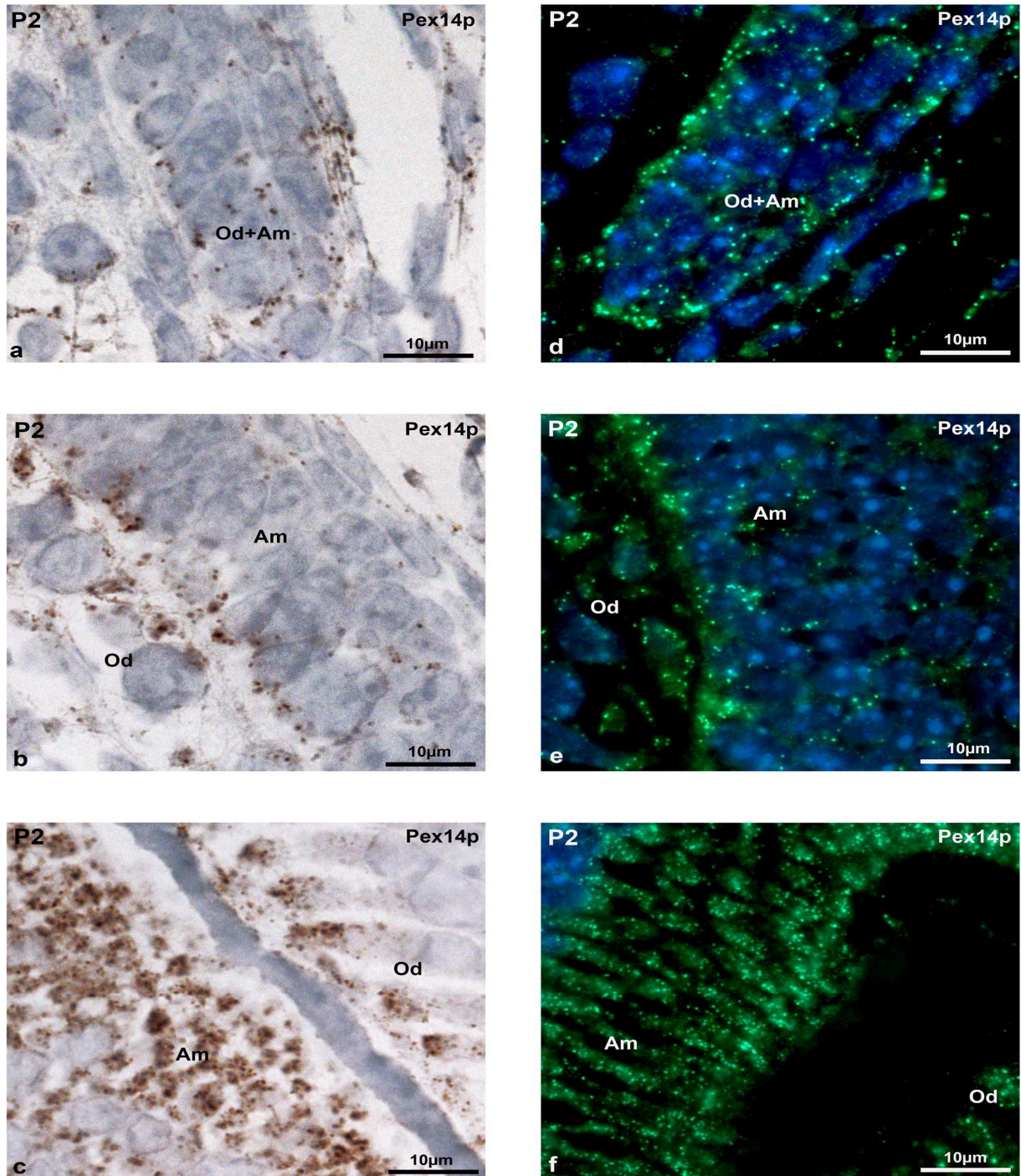
\* zu dem Zeitpunkt noch nicht entwickelt

Höhere Vergrößerungen von Markierungen für Pex14p unterschiedlicher Differenzierungsphasen (2 Tage alte Maus, 2. Molar) der Hartschubstanz produzierenden Zellen erbrachten die erwarteten signifikanten Unterschiede in der Organellenverteilung und numerischen Dichte der Peroxisomen in den verschiedenen Zelltypen. Die stärkste Anhäufung der Peroxisomen war in den Ameloblasten, die sich in der Sekretionsphase (Phase 3) befanden, nachzuweisen (Abb. 13c,f). Die Odontoblasten enthielten im Vergleich hierzu weniger Peroxisomen. Dafür erschien die Dichte der Peroxisomen in der Differenzierungsphase im Vergleich zu Ameloblasten leicht vermehrt zu sein (Abb. 13b,e). In der Anfangsphase mit Präamelo- und Odontoblasten lag eine gleichmäßige Verteilung und Dichte der Peroxisomen beider Zelltypen vor (Abb. 13a,d). Besonders durch die Verwendung des Immunfluoreszenzverfahrens zur Pex14p-Lokalisation konnten individuelle Organellen sehr gut dargestellt und Unterschiede zwischen den Odontoblasten und den Ameloblasten besser sichtbar gemacht werden. Besonders reichlich waren Peroxisomen in den Ameloblasten- und Odontoblastenfortsätzen aufzufinden (Abb. 13c,f).

Im Vergleich zu Pex14p fielen starke Unterschiede in der Verteilung von Katalase in den Peroxisomen verschiedener Zelltypen auf (Abb. 14). In der Anfangsphase (Phase 1) mit Präamelo-/odontoblasten ist Katalase bereits gut in Peroxisomen detektierbar. Die Organellen in der Katalasefärbung wiesen ein ähnliches Verteilungsmuster wie in den Pex14p-Färbungen auf. In diesem Stadium waren alle Organellen gleichmäßig in beiden Zelltypen verteilt. Auch in der Phase der Differenzierung (Phase 2) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Amelo- und Odontoblasten. Im Gegensatz hierzu wiesen jedoch beide Zelltypen in der Phase der Sekretion (Phase 3) ein komplett anderes Muster auf als im Vergleich zu den Pex14p-Färbungen. Die sezernierenden Ameloblasten enthielten kaum Katalase, während in den Odontoblastenfortsätzen das Enzym deutlich nachzuweisen war.

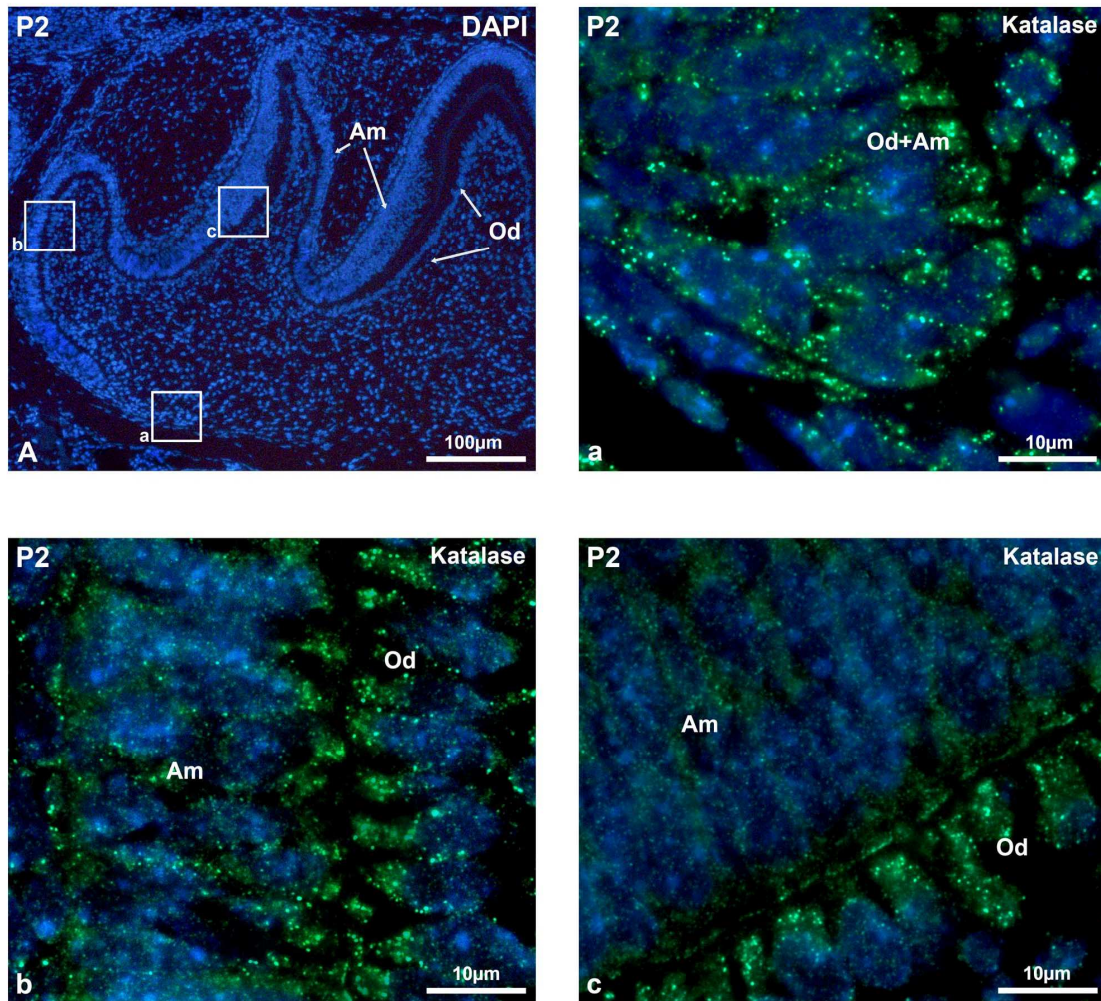
Um noch bessere Aussagen über eventuelle Unterschiede im Metabolismus der Peroxisomen zwischen sezernierenden Amelo- und Odontoblasten machen zu können, wurden weitere peroxisomale Proteine in späteren Experimenten mittels Immunfluoreszenz nachgewiesen. Die besten Ergebnisse zur Darstellung dieser Proteine und der Organellen an sich in unterschiedlichen Zahngeweben gelang über Doppelimmunfluoreszenz mit anschließender CLSM-Analyse.





**Abb.13: Höhere Vergrößerungen der einzelnen Entwicklungsphasen der Amelo- und Odontoblasten aus Abb.12.** Vergleich von IHC-Methode (a-c) und IF-Methode (d-f). In beiden Methoden wurden die Peroxisomen mittels anti-Pex14-Antikörper lokalisiert. a+d: Präameloblasten und Präodontoblasten, b+e: Zellen in der Differenzierungsphase, c+f: Zellen in der Sekretionsphase. Am=Ameloblasten, Od=Odontoblasten. Die Länge der Maßstäbe entspricht 10µm.

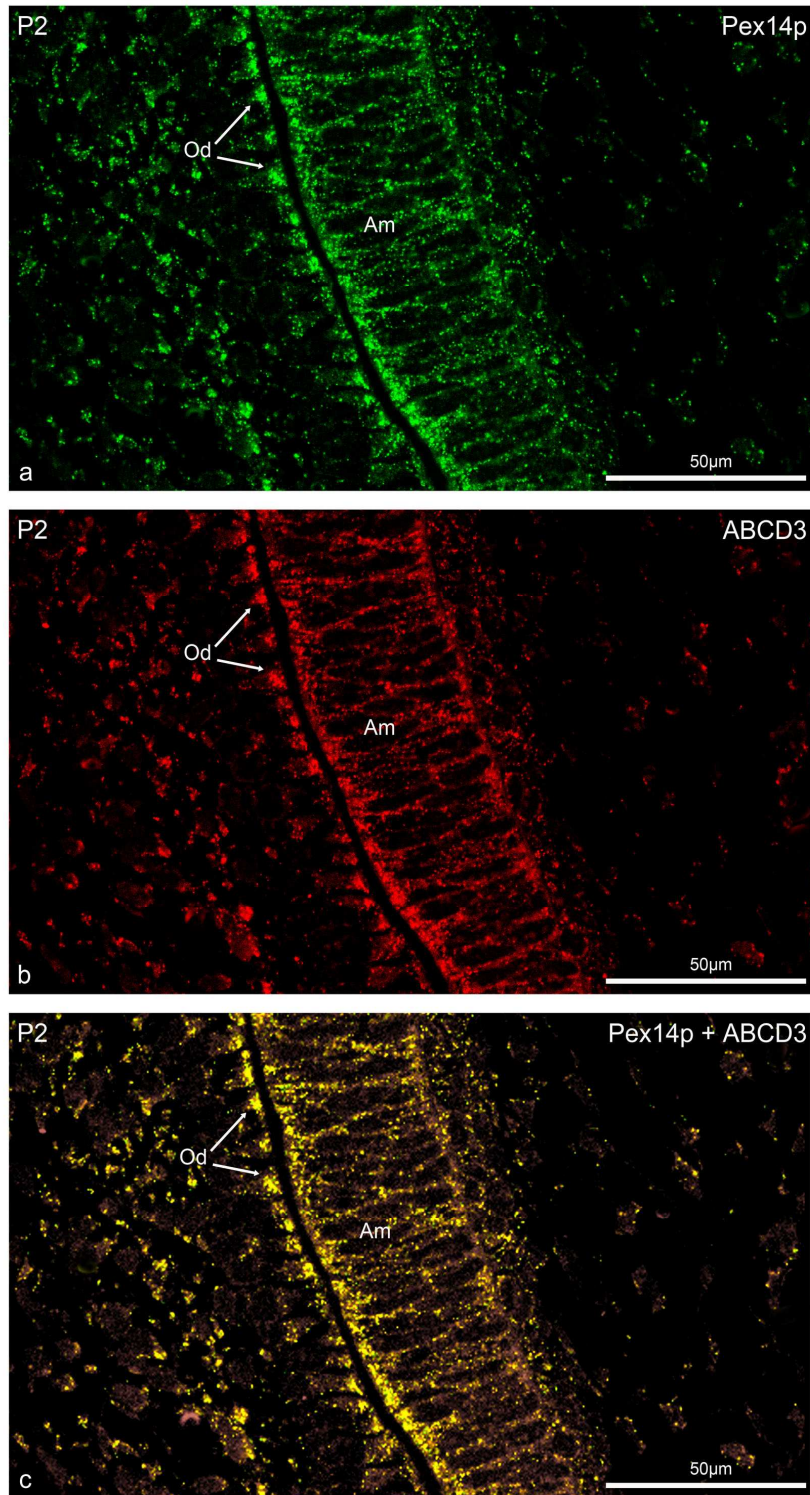




**Abb.14: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Katalaseverteilung in Amelo- und Odontoblasten verschiedener Differenzierungsphasen (Phase1-3) eines 2.Molaren der Maus.** A) DAPI-Färbung zur Darstellung der Zellkernverteilung. Übersicht der unterschiedlichen Phasen während Amelo- und Odontoblastenentwicklung eines 2.Molaren im späten Glockenstadium. a-c Immunfluoreszenz (IF) zur Katalaselokalisation mit Kernfärbung: a) Präamelo-/Präodontoblasten (Phase1), b) Amelo- und Odontoblasten, beide in der Differenzierungsphase (Phase2), c) Zellen in der Sekretionsphase (Phase3). Am=Ameloblasten, Od=Odontoblasten. Die Länge der Maßstäbe entspricht 10µm.

#### 4.3.3. Verteilung der unterschiedlichen peroxisomalen Proteine abhängig von dem Maturierungsgrad der Ameloblasten und Odontoblasten

Pex14p und ABCD3 (Lipidtransporter der Peroxisomenmembran) waren unter allen Markerproteinen diejenigen, die am besten in Immunfluoreszenzpräparaten nachgewiesen werden konnten und die gleichmäßigste Verteilung während der Differenzierung der hartsubstanzbildenden Zellen aufwiesen (Abb. 15). Die komplette Kolo-kalisation dieser beiden Proteine in Abbildung 15 beweist die hohe Qualität der angewendeten Methode und die sehr gute Spezifität der verwendeten Antikörper zur Peroxisomenlokalisation. Beide Proteine waren in allen Peroxisomen vorhanden, jedoch zeigte der Lipidtransporter ABCD3 eine leicht

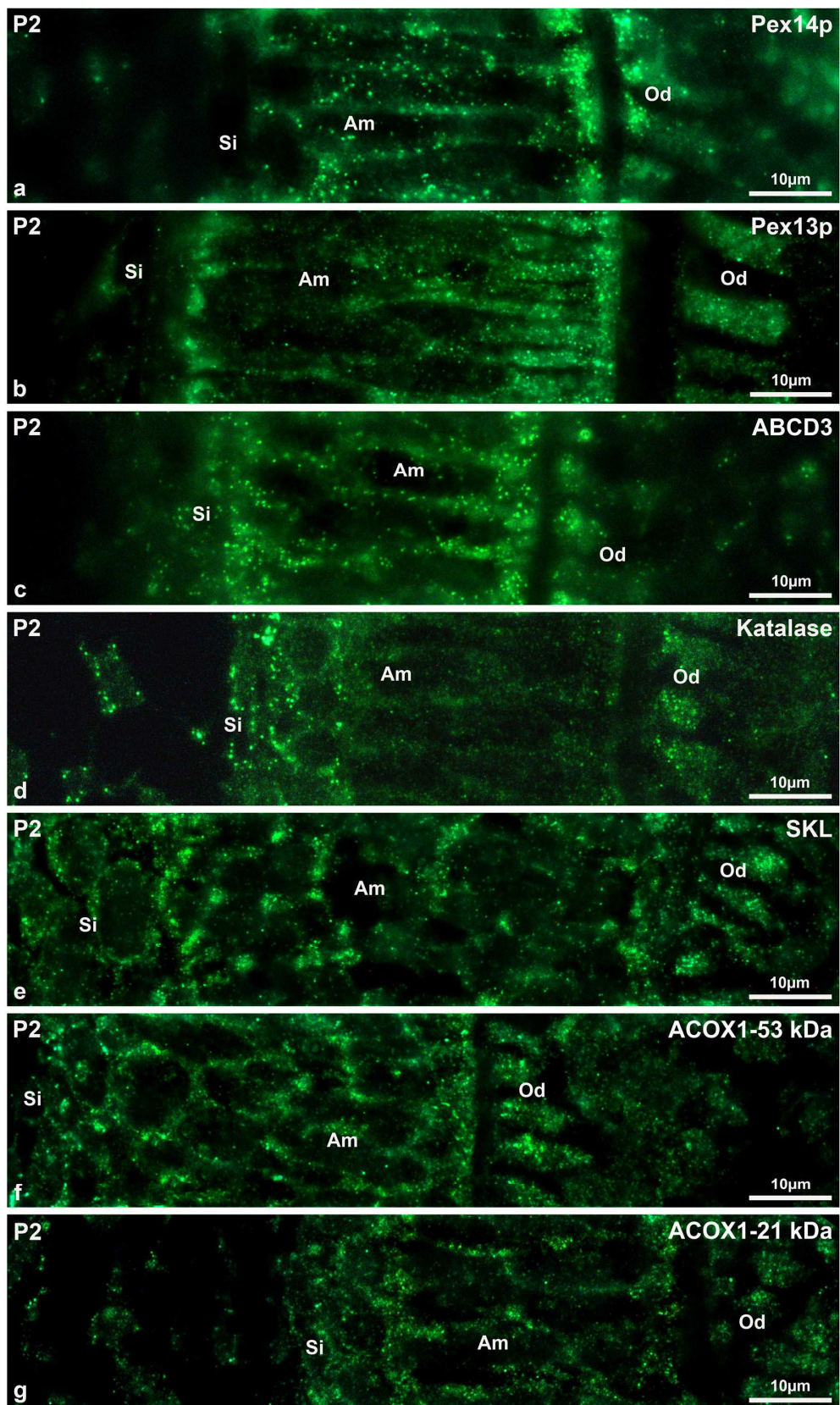


**Abb.15: CLSM-Aufnahmen eines Doppelimmunfluoreszenzpräparates (Pex14p und ABCD3).** Die Doppelimmunfluoreszenz lieferte den eindeutigen Nachweis der Identität der dargestellten Organellen als Peroxisomen. Anti-Pex14p-Antikörper (grün, anti-Kaninchen-AlexaFluor488) und anti-ABCD3-Antikörper (rot, anti-Schaf-Rhodamin-Rot), die eine komplette Kolokalisation beider Proteine erbrachten. Am=Ameloblasten, Od=Odontoblasten. Die Länge der Maßstäbe entspricht 50µm.

höhere Präferenz der Markierung von Peroxisomen der differenzierten Amelo- und Odontoblasten im Vergleich zu dem Biogeneseprotein Pex14p, was die leicht grüne Färbung einzelner Peroxisomen in Zellen der Pulpa und der Schmelzpulpa erklärt und auf einen vermehrten Lipidtransport im Ameloblasten und Odontoblasten einweist. Obwohl für alle peroxisomalen Proteine eine Doppelinkubation mit ABCD3 angefertigt wurde, wurde aus Platzgründen in dieser Dissertation nur diejenige mit Pex14p und ABCD3 abgebildet, während für alle anderen die Darstellung in Einzelfluoreszenzen in Gegenüberstellung zueinander ausgewählt wurde. Im Vergleich zur regulären Fluoreszenzmikroskopie erreichte man mit dem konfokalen Lasermikroskop (CLSM) eine verbesserte Auflösung der individuellen Organellen zueinander und deren zelltypspezifische Verteilung in Zahngeweben (vergleiche hierzu die Aufnahmen mit höherer Vergrößerung in Abb.16 und 17).

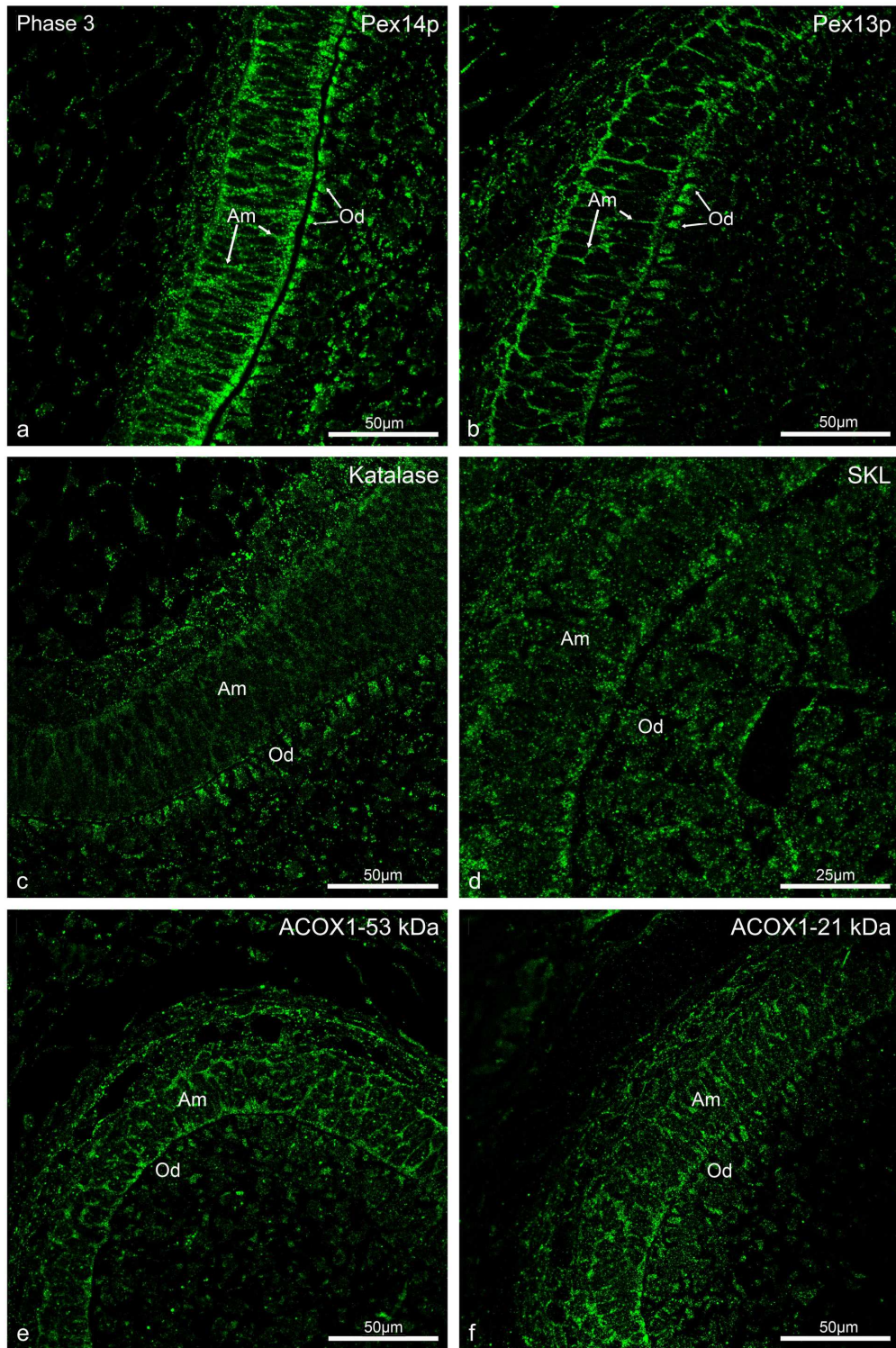
Mit Zunahme des Differenzierungsgrades der Ameloblasten und Odontoblasten konnten auch schwach exprimierte peroxisomale Proteine, wie z.B. Acyl-CoA-Oxidase I (Abb. 16f+g) und alle Matrixproteine mit der C-terminalen peroxisomalen Zielerkennungssequenz „SKL“ (Abb.16e) nachgewiesen werden. Die stärksten Anfärbungen wurden für alle Membranproteine (Pex14p, Pex13p, ABCD3) in den Ameloblasten-Fortsätzen während der Sekretionsphase gefunden (Abb.16a-c). Im Vergleich zu Pex14p und ABCD3 war Pex13p in geringerer Menge in den individuellen Organellen vorhanden, was sich durch eine geringere Fluoreszenzintensität und kleiner Partikeldarstellung zeigte. Noch geringfügiger fiel die Markierung für das  $\beta$ -Oxidationsprotein Acyl-CoA Oxidase I aus, welches durch Färbungen mit zwei unterschiedlichen Antikörpern gegen die zwei verschiedenen Untereinheiten der AcoxI bestätigt wurde. In beiden Färbungen zeigte sich das gleiche Muster von sehr feinen Partikeln (Abb.16f+g). Eine vergleichbar geringe Markierungsintensität wurde auch mit dem Antikörper gegen die peroxisomale Zielerkennungssequenz (-„SKL“) in verschiedenen Matrixproteinen erzielt (Abb.16e). Im Gegensatz zu allen anderen peroxisomalen Markerproteinen, zeigte die Katalase, wie schon in vorhergehenden Kapiteln erwähnt, ein komplett anderes Verteilungsmuster. Deren Expressionsmenge war fast vergleichbar mit der von Pex14p in Zellen in Phase 1 und Phase 2, doch in den sekretorischen, ausgereiften Ameloblasten (Phase 3) war kaum Katalase detektierbar (Abb.16d). Im direkt benachbarten Stratum intermedium, der Schmelzpulpa sowie in den Odontoblasten und den Zellen der Pulpa hingegen war die Katalase auch in diesem Stadium in hoher Menge vorhanden.





**Abb.16: Verteilung der unterschiedlichen peroxisomalen Proteine in höheren Vergrößerungen der hartsubstanzbildenden Zellen des 2. Molaren der Maus im späten Glockenstadium.** Amelo- und Odontoblasten befinden sich in der Sekretionsphase (Phase 3). Lokalisation von Pex14p (a), Pex13p (b), ABCD3 (c), Katalase (d), SKL-haltige Matrixproteine (e), AcylCoA-Oxidase-Untereinheit B(53kDa) (f), AcylCoA Oxidase-Untereinheit C(21kDa)(g). Am= Ameloblasten, Od=Odontoblasten, Si=Stratum intermedium. Die Länge der Maßstäbe entspricht 10µm.





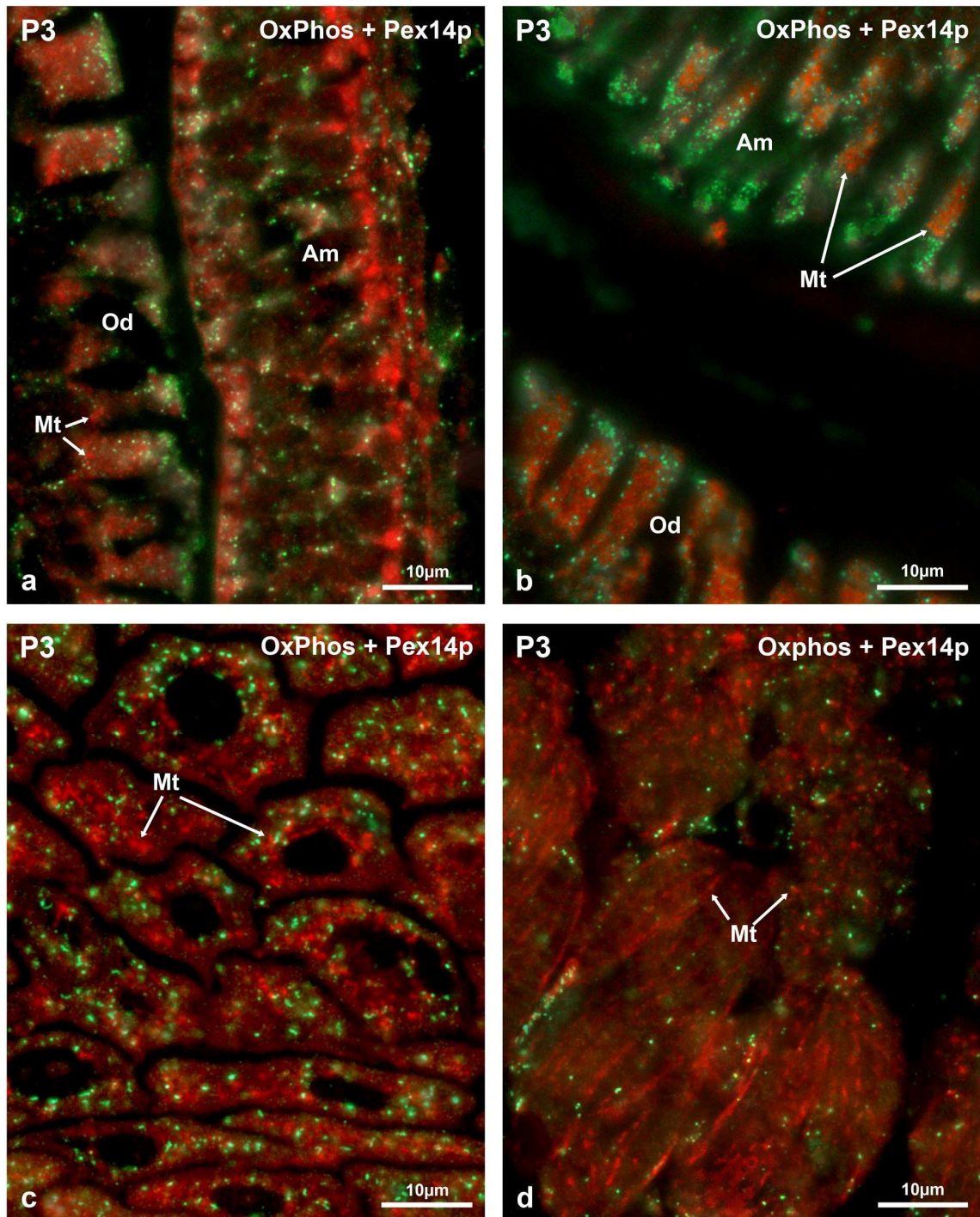
**Abb.17: CLSM-Aufnahmen der peroxisomalen Proteine der Zahnabschnitte aus den verschiedenen Präparaten mit Zellen in der Sekretionsphase (Phase 3).** Lokalisation von Pex14p (a), Pex13p (b) Katalase (c), SKL-haltigen Matrixproteinen (d), und den verschiedenen Untereinheiten der AcylCoA-Oxidase 1 (e+f). ZU besseren Sichtbarmachung der schwächer angefärbten Peroxisomen im „SKL“-Präparat (d) wurde der Ausschnitt leicht höher vergrößert. Am=Ameloblasten, Od=Odontoblasten. Die Länge der Maßstäbe entspricht 50µm (a-c, e, f) bzw. 25µm (d).

Wie bereits weiter oben erwähnt, erfolgte die optimale Darstellung der verschiedenen Proteine mittels CLSM (Abb.17). Hier lassen sich die Unterschiede der peroxisomalen Enzymverteilung zwischen Amelo- und Odontoblasten sehr gut erkennen. Wie auch mit dem regulären Fluoreszenzmikroskop bereits festgestellt, wurde die stärkste Anfärbung der Organellen durch den anti-Pex14p-Antikörper erreicht. In Präparationen zur Katalaselokalisation war wiederum das spezifische Verteilungsmuster dieses Proteins im Vergleich mit allen anderen zu erkennen. Die Ameloblasten zeigten kaum eine Markierung, jedoch das Stratum intermedium und die Odontoblasten sehr deutlich. Im Gegensatz hierzu zeigten die „SKL“-haltigen Matrixproteine (Abb. 17f) und die Acox1 (Abb. 17e,f) ein gleichmäßiges Verteilungsmuster in Amelo- und Odontoblasten.

#### **4.3.4. Lokalisation von Peroxisomen im Vergleich zu Mitochondrien mittels Doppelimmunfluoreszenz in Zahngewebe**

Um das spezifische Verteilungsmuster von Peroxisomen im Vergleich zu Mitochondrien zu demonstrieren, beides Organellen, die die  $\beta$ -Oxidation von Lipiden durchführen, wurde eine Doppel-Färbung, mittels jeweils eines Antikörpers gegen Pex14p und gegen den Komplex III (OxPhos) der Atmungskette angefertigt. Wie aus Abbildung 18 ersichtlich ist, konnten beide subzellulären Organellenkompartimente eindeutig gut voneinander getrennt dargestellt werden. In diesen Doppelimmunfluoreszenzpräparaten wurde ein signifikanter Unterschied im Verteilungsmuster und in der Organellendichte zwischen den Mitochondrien und Peroxisomen in Zahngewebe nachgewiesen (Abb. 18a, b). Als Positivkontrollen, zur Abschätzung der Markierungsqualität, dienten für alle durchgeführten Experimente das Mundhöhlenepithel (Abb. 18c) und die Skelettmuskulatur im Kopf-Hals-Bereich (Abb. 18d). Die beiden unterschiedlichen Ausschnitte, mit hartsubstanzbildenden Zellen aus dem 2. Molaren einer drei Tage alten Maus, wurden bewusst ausgewählt, um die intrazelluläre Verteilung von Mitochondrien und Peroxisomen in der Differenzierungsphase (Phase 2) im Vergleich zur späten Sekretionsphase (Phase 3) zu demonstrieren. Während Mitochondrien vermehrt in hartsubstanzfernen Arealen in Amelo- und Odontoblasten in der Differenzierungsphase (Phase2) lokalisiert waren, wurden die Peroxisomen in Odontoblasten vermehrt hartsubstanznah (d.h. apikal) vorgefunden, während die sich in den sich differenzierenden Ameloblasten in Phase 2 noch relativ gleichmäßig in den Zellen verteilt erschienen. Im späten Sekretionsstadium dagegen nahm das peroxisomale Kompartiment vorwiegend die fortsatznahen Anteile der Amelo- und Odontoblasten ein und war dort vermehrt vorhanden. Die Mitochondrien dagegen wanderten im Vergleich zu Peroxisomen





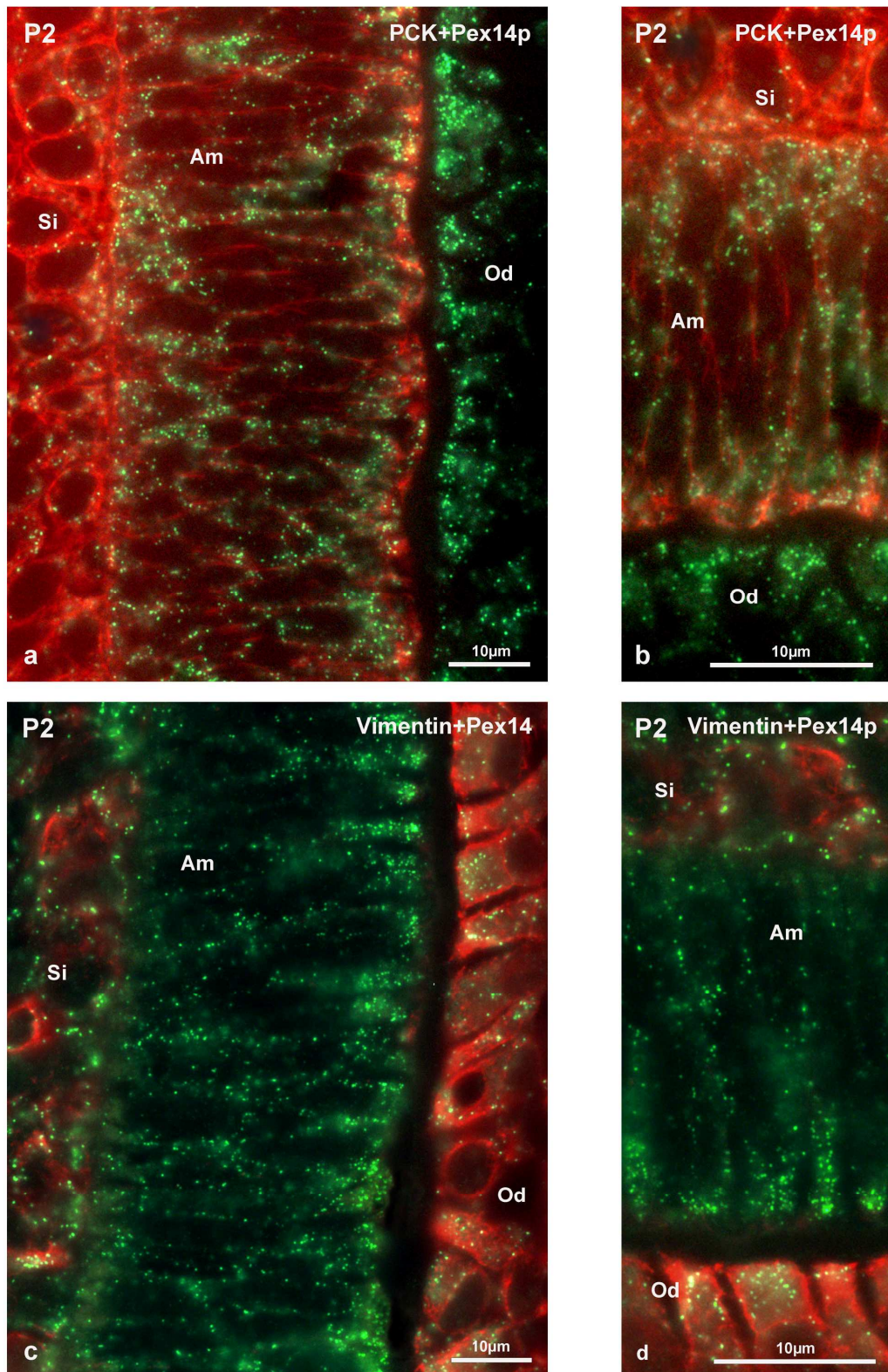
**Abb. 18: Verteilung von Peroxisomen und Mitochondrien in verschiedenen Phasen der Amelo- und Odontoblastenmaturierung durch Doppelimmunfluoreszenz für Pex14p und Komplex III der Atmungskette.** a) Verteilung beider Organellen in der späten Differenzierungsphase (Phase 2). b) Verteilung der Organellen in der späten Sekretionsphase (Phase 3). Positivkontrollen zur Lokalisation von beiden Organellen in Mundhöhlenepithel (c) und in der Skelettmuskulatur des Kopf-Hals-Bereichs (d). Am=Ameloblasten, Mt=Mitochondrien, Od=Odontoblasten. Färbung: anti-Kaninchen AlexaFluor488 (grün) gegen Kaninchen-anti-Pex14p, anti-Maus-Texas Rot (rot) gegen Maus-anti OxPhos.

vermehrt ins Innere der Zellen. Diese spezifische Lokalisation der unterschiedlichen Organellen in verschiedenen Zellanteilen läßt auf ihre unterschiedlichen Funktionen während der Hartsubstanzbildung schließen.

#### **4.3.5. Lokalisation von Peroxisomen entlang von Cytokeratinfilamenten**

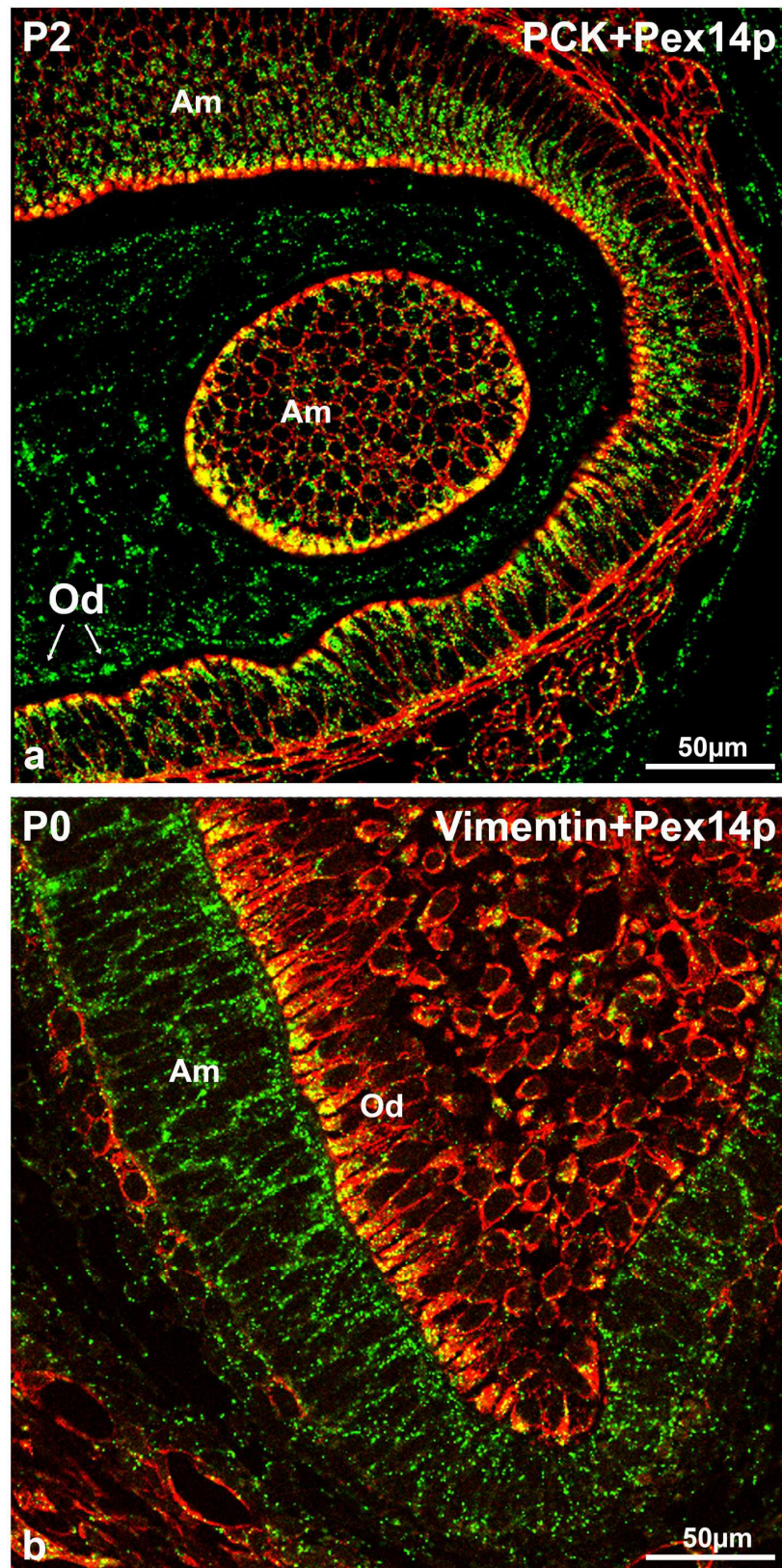
In den anfänglichen Untersuchungen dieser Dissertation wurden spezifische Intermediärfilamentfärbungen zur eindeutigen Identifikation von Amelo- und Odontoblasten durchgeführt. Dabei erwies sich der Pancytokeratin-Antikörper (PCK-26) als sehr erfolgreich zur Darstellung des gesamten Mundhöhlenepithels, der Zahnleisten, des inneren und äußeren Schmelzepithels des Kappenstadiums, sowie der gesamten Zellen der Schmelzpulpa und aller Ameloblasten. Im Gegensatz hierzu, wurden die Odontoblasten mit anti-Vimentin-Antikörpern nachgewiesen. Interessanterweise waren einige Zellen des Stratum intermedium sowohl positiv für Cytokeratin als auch Vimentin. In Doppelimmunfluoreszenzen mit peroxisomalen Markern fiel auf, dass Peroxisomen sehr häufig an Cytokeratinfilamente der Ameloblasten assoziiert erschienen und am besten im mittleren Abschnitt der Zellen zu erkennen waren. In regulären fluorezenzmikroskopischen Aufnahmen war dies bereits zu erahnen (Abb. 14), während die CLSM-Aufnahmen hierüber Gewissheit erbrachten (Abb. 20). In diesen Darstellungen kommt die Verteilung der Peroxisomen auch bereits in Übersichtsaufnahmen in den unterschiedlichen Zelltypen der Zahngewebe sehr gut zum Ausdruck. Die besondere Anreicherung dieser Organellen wird wiederum in den fortsatznahen Anteilen der Amelo- und Odontoblasten deutlich. Schön zu sehen sind hierbei auch die Peroxisomen im Stratum intermedium und der Schmelzpulpa (Abb. 20a) im Vergleich zu den peroxisomalen Kompartimenten in Zellen der Zahnpulpa (Abb. 20b).





**Abb. 19: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Doppellokalisierung für Pex14p und verschiedene Intermediärfilamente.** a) Übersichtsaufnahme zur Lokalisation von Pex14p und Cytokeratinen. b) Höhere Vergrößerung von Amelo- und Odontoblasten der frühen Sekretionsphase (Phase 3). c) Übersichtsaufnahme zur Lokalisation von Pex14p und Vimentin, d) höhere Vergrößerung von Amelo- und Odontoblasten in der frühen Sekretionsphase (Phase 3). Am=Ameloblasten, Od=Odontoblasten, Si=Stratum intermedium. Die Doppelfärbung wurde durch Inkubation mit Kaninchen-anti-Pex14p-Antikörper/Esel-anti-Kaninchen IgG-Alexa488 und Maus-anti-Pancytokeratin bzw. Maus-anti-Vimentin/Ziege-anti-Maus-TexasRot angefertigt. Die Länge der Maßstäbe entspricht 10μm.





**Abb. 20: CLSM- Übersichtsaufnahmen von Doppellokalisierung für Pex14p und verschiedene Intermediärfilamente.** a) Übersichtsaufnahme zur Lokalisation von Pex14p und Cytokeratinen. b) Übersichtsaufnahme zur Lokalisation von Pex14p und Vimentin, Am=Ameloblasten, Od=Odontoblasten. Die Doppelfärbung wurde durch Inkubation mit Kaninchen-anti-Pex14p-Antikörper/Esel-anti-Kaninchen IgG-Alexa488 und Maus-anti-Pancytokeratin bzw. Maus-anti-Vimentin/Ziege-anti-Maus-TexasRot angefertigt. Die Länge der Maßstäbe entspricht 50µm.

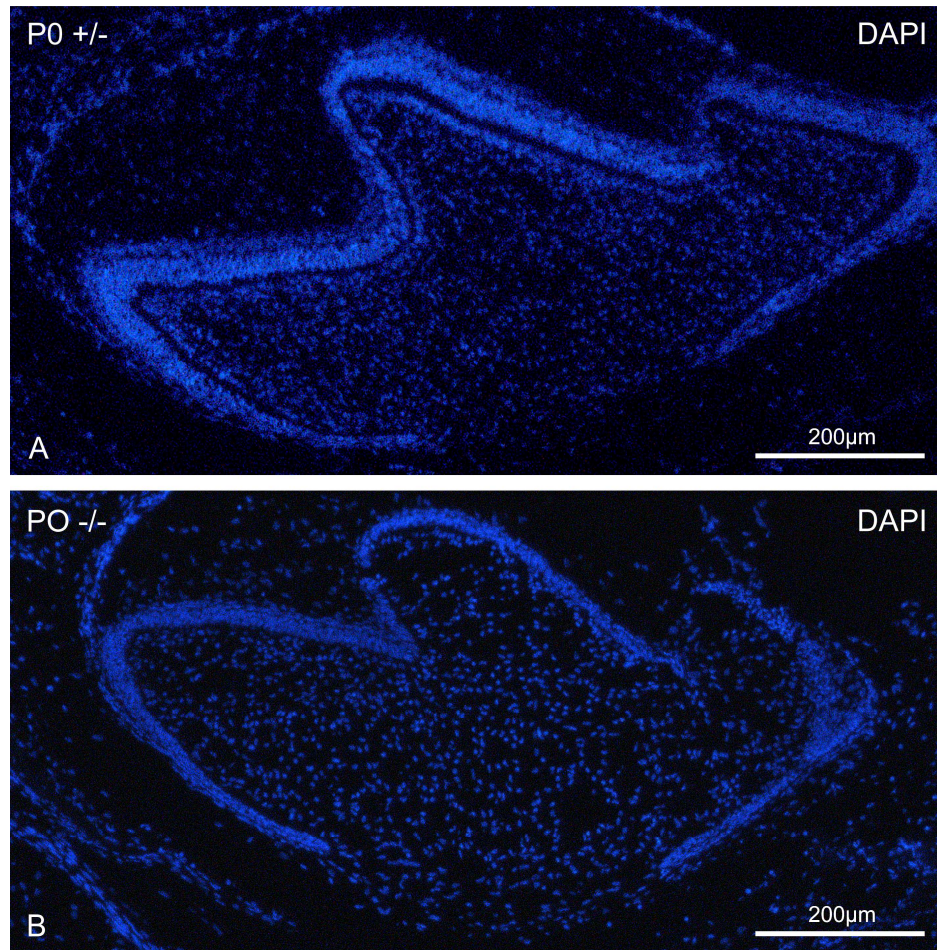
#### **4.3.6. Erste vergleichende Untersuchungen des peroxisomalen Kompartiments und der Veränderung der Zahngewebe in PEX11 $\beta$ -Knockout-Mäusen**

Aus der Literatur ist bekannt, dass Patienten mit peroxisomalen Erkrankungen Zahndefekte und -fehlstellungen aufweisen (Poll-Thé et al. 2004). Um einen eventuellen Effekt des peroxisomalen Stoffwechsels auf die Zahnentwicklung festzustellen, wurden erste Untersuchungen mit PEX11 $\beta$ -Knockout-Mäusen im Vergleich zu heterozygoten Tieren und Wildtypmäusen durchgeführt. PEX11 $\beta$ -Knockout-Tiere besitzen einen Defekt in der Peroxisomenproliferation und versterben bereits früh nach der Geburt. Deshalb konnten alle folgenden Untersuchungen nur an Zähnen von neugeborenen Mäusen (P0) durchgeführt werden. Bei PEX11 $\beta$ -Knockout-Mäusen waren eine eindeutige Retardierung der Zahnentwicklungsstadien (Abb. 21) und vereinzelte Lücken im Zellverband der Ameloblasten festzustellen.

Es zeigten sich jedoch keine sehr schwerwiegenden Alterationen (Verteilungs- oder Auflösungsstörungen, in dem Epithelverband der Ameloblasten oder im Zellverband der Odontoblasten), wie sie generell bei starken Defekten von spezifischen Transkriptionsfaktoren zur Steuerung der Zahnentwicklung vorkämen.

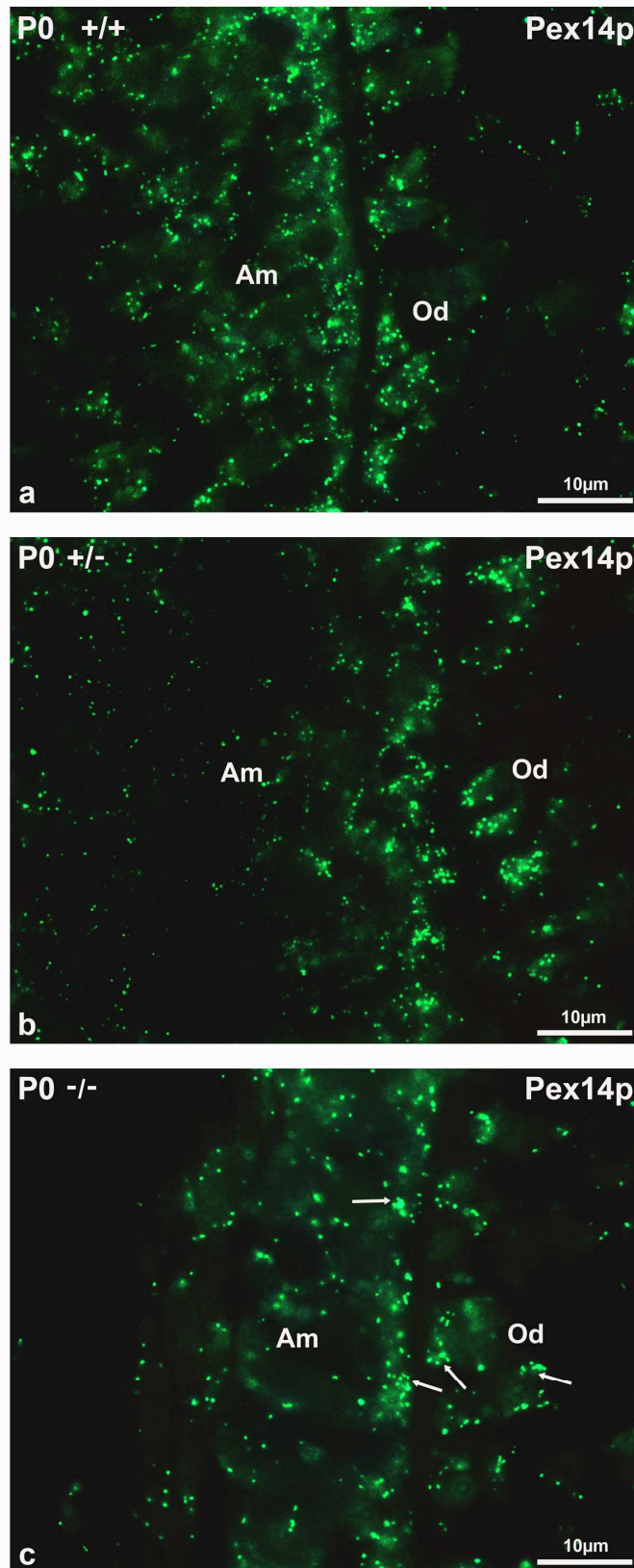
Auch die strukturelle Ausprägung des peroxisomalen Kompartiments war in allen unterschiedlichen Zahngeweben der PEX11 $\beta$ -Knockout-Tiere im Vergleich zu heterozygoten Tieren (Abb. 22b) und zu Kontrolltieren (Abb. 22a) stark verändert. Peroxisomen waren in der Anzahl reduziert, waren jedoch individuell leicht vergrößert und lagen häufig zu Clustern gruppiert (Abb. 22c). Bei höherer Vergrößerung ließen sich die Gruppen von einzelnen Peroxisomen in diesen Clustern auflösen, die jedoch eindeutig ein tubuläres Erscheinungsbild aufwiesen. Zukünftige, weitergehende vergleichende Untersuchungen mit einer größeren Anzahl von Mäusen und Markerantikörpern sind jedoch notwendig, um diesen Befund statistisch abzusichern und eventuelle metabolisch-bedingte Veränderungen der peroxisomalen Enzyme und andere Proteine des ROS- und Lipidstoffwechsels der verschiedenen subzellulären Zellkompartimente nachzuweisen.





**Abb.21:** Fluoreszenzmikroskopische Übersichtsaufnahme in DAPI-Färbung zum Vergleich des Entwicklungszustandes der Zähne zwischen neugeborenen heterozygoten Mäusen(+/-) und PEX11 $\beta$ KO-Mäusen (-/-). A) Heterozygote Maus, B) PEX11 $\beta$ -Knockoutmaus. Die Länge der Maßstäbe entspricht 200 $\mu$ m.

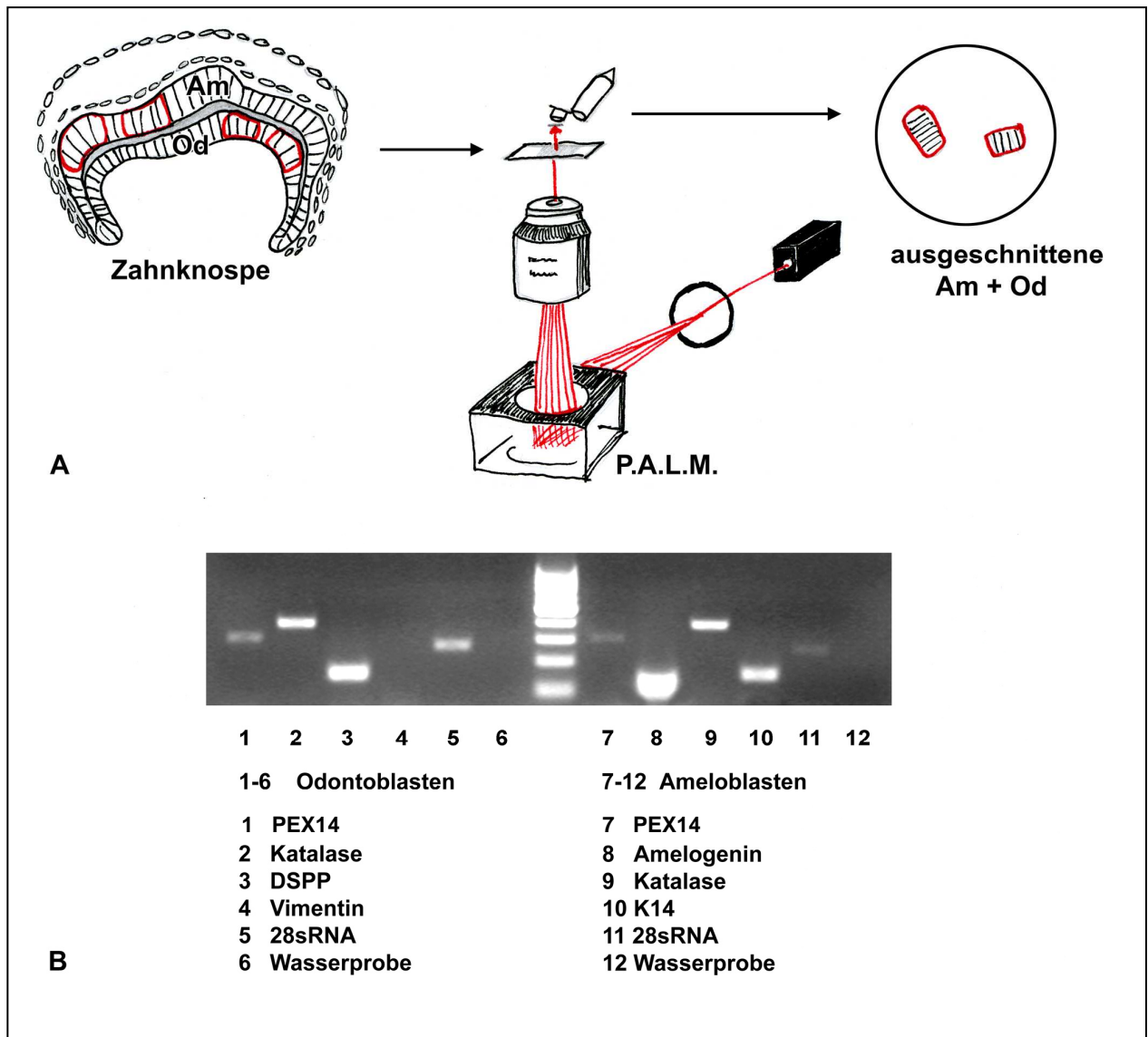




**Abb.22: Pex14p in Wildtyp-Mäusen, heterozygoten Tieren, und PEX11 $\beta$ -Knockout Mäusen.** a) Wildtyp-Mäuse (+/+), b) heterozygote Mäuse (+/-), c) PEX11 $\beta$ -Knockout-Mäuse (-/-). Am=Ameloblasten, O=Odontoblasten, Pfeile weisen auf Peroxisomencluster in PEX11 $\beta$ -KO-Tieren hin. Die Länge der Maßstäbe entspricht 10µm.

#### **4.4. Mikrodissektion von Odontoblasten und Ameloblasten zum Nachweis spezifischer mRNA-Expressionsmuster peroxisomaler Gene in beiden Zelltypen**

Odontoblasten und Ameloblasten wurden nach einer ultrakurzen Hämatoxilininfärbung der Gefrierschnitte mit 10µm Dicke mit dem Lichtmikroskop, ausgestattet mit dem Dissektionslaser, in Phasenkontrastoptik identifiziert (Abb. 23a). Die Zellen des späten Glockenstadiums wurden mit einem durchschnittlichen Energielevel von 80 µJ pro Impuls und einem Schneidedurchmesser von 85µm ausgeschnitten. Diese Werte bewiesen sich nach Vorversuchen in einer Testphase mit 10 Schnitten als optimal. Die ausgeschnittenen Zellen wurden in ein Tube katapultiert. Ca. 70 Zellen wurden jeweils von Amelo- und Odontoblasten gesammelt (Abb. 23A). Vor der Verwendung der kostbaren Mikrodissektions-Proben für die Gesamt-RNA-Isolierung und RT-PCR-Analyse erfolgte eine Testphase mit Isolierung von RNA aus eingefrorenen kompletten Mäusekiefen mit Zähnen. Erst danach wurde die RNA aus den spezifischen mikrodissektierten Proben von sezernierenden Ameloblasten und Odontoblasten des späten Glockenstadiums isoliert und in der RT-PCR eingesetzt. Zur Etablierung der PCR-Bedingungen zum Nachweis von mRNAs verschiedener peroxisomaler und Amelo- Odontoblasten-spezifischen Proteinen wurde die Gesamt-RNA aus Kieferpräparationen von neugeborenen Mäusen mit Zähnen verwendet. Für jedes ausgewählte Primerpaar wurde eine Gradienten-PCR zur Ermittlung der optimalen Annealing-Temperatur durchgeführt. Alle Primerpaare erbrachten spezifische Banden in der gewünschten Höhe nach Agarosegelelektrophorese. Als spezifische PCR-Marker für Ameloblasten wurden Amelogenin- und Cytokeratin14, sowie für Odontoblasten Dentinsialophosphoprotein (DSPP) und Vimentin eingesetzt (Abb. 23B). Bis auf das Vimentin-Primer-Paar erbrachten alle Markerprimer die erwarteten PCR-Banden. Interessanterweise erschienen die Primerpaare zur Amplifikation der mRNAs der extrazellulären Matrixproteine wesentlich dickere Banden als die für Cytokeratin14 bei der Verwendung gleicher Menge cDNA. Leider erbrachten auch die Amplifikation der 28S ribosomalen RNA (28SRNA), die normalerweise zur Standardisierung der eingesetzten cDNA-Mengen verwendet wird, unterschiedliche Ergebnisse in Amelo- und Odontoblasten. Alle Negativkontrollen (Wasserproben) blieben ohne unspezifische Amplikate. Die Primerpaare zum Nachweis von PEX14 und Katalase-mRNA funktionierten beide, zeigten jedoch kaum Unterschiede zwischen den verschiedenen Zelltypen an (Abb.23B).



**Abb. 23: Mikrodissektion und spezifische RT-PCR-Reaktionen für mRNAs von Ameloblasten und Odontoblasten.** A) Übersichtszeichnung zur angewandten Methode (eigene Zeichnung). B) Gelelektrophorese nach erfolgter RT-PCR zur Amplifikation von spezifischen mRNAs in Amelo- und Odontoblasten. Am=Ameloblasten, DSPP=Dentinsialophosphoprotein, K14=Cytokeratin 14, Od=Odontoblasten, 28sRNA=28S ribosomale RNA.

## **5. Diskussion**

Peroxisomen sind ubiquitäre Zellorganellen, deren Funktion in unterschiedlichen Organsystemen jedoch sehr stark variieren (Baumgart 1997). Bisher liegen keine Studien vor, in denen Peroxisomen und Zahngewebe immunhistochemisch untersucht wurden. Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sind Methoden etabliert und optimiert worden, um an Serienschnitten von fötalen, neugeborenen und erwachsenen Mäusen peroxisomale Proteine im Zahngewebe in hoher licht- und fluoreszenzmikroskopischer Auflösung zu detektieren und damit über die Funktion dieser Organellen nähere Kenntnisse zu erwerben. Mit diesen Methoden (Fluoreszenzfärbung, Immunhistochemie) wurden peroxisomale Proteine oder mRNAs während der Zahnentwicklung (E13.5 bis 3 Monate) an Wildtypmäusen, sowie der transgenen Maus, nachgewiesen. Weiterhin wurde über RT-PCR-Analysen von mikrodissektierten Material am differenzierten Amelo- und Odontoblasten entsprechende mRNAs nachgewiesen. Die Untersuchungen erbrachten eine starke Heterogenität von verschiedenen peroxisomalen Markerproteinen in unterschiedlichen Zahngeweben. Diese Heterogenität konnte auch auf RNA-Ebene zellspezifisch bestätigt werden. Weiterhin wurden erste Veränderungen in den verschiedenen Zahngeweben bei PEX11 $\beta$ -Knockoutmäusen analysiert, einem Tiermodell mit defizienter Peroxisomenbiogenese durch fehlerhafte Proliferation dieser Organellen.

### **5.1. Verschiedene Zahnstadien**

Nagetiere als Versuchstiere, wie z.B. Ratten und Mäuse eignen sich hervorragend zur Untersuchung der biologischen Funktion der Peroxisomen und den pathologischen Konsequenzen bei deren Fehlfunktion. Deshalb wurden diese Tierspezies in der Vergangenheit auch am häufigsten für experimentelle Studien über Peroxisomen eingesetzt (Fahimi 1974; Fahimi und Baumgart 1999; Grabenbauer 2001). Zur biochemischen Charakterisierung dieser Organellen wurden vor allem Leber- und Nierengewebe verwendet (Völkl et al 1998). Wie oben erwähnt gibt es über Peroxisomen im Zahngewebe bisher keine Informationen, obwohl bei Patienten mit peroxisomalen Erkrankungen Zahnveränderungen beschrieben wurden (Poll-The et al 2004). Zum Studium der molekularen Pathogenese dieser Zahnveränderungen in entsprechenden Knockoutmausmodellen, musste jedoch das Vorkommen der Peroxisomen und deren funktionelle Bedeutung erst in Wildtypmäusen während der Zahnentwicklung beschrieben werden. Deshalb wurden als Erstes verschiedene Zahnstadien von Wildtyp C57BL/6J-Mäusen gewonnen. Diese Stadien wurden nach der

Tabelle von Ruch (1987) (Schroll 2004) ausgesucht, in der eine gute Übersicht über die komplette Zahnentwicklung der Maus beschrieben wurde. Tatsächlich konnten in der vorliegenden Dissertation an den ausgesuchten Mäusen ein komplettes Kontinuum der Zahnentwicklung mit allen notwendigen Strukturen nachgewiesen werden.

Die Züchtung der Entwicklungsstufen E13,5 – E15,5 – E18,5 – P0 – P1 – P2 – P3 und P90 (3 Monate) alter Mäuse ergab eine Reihe von verschiedenen Altersstadien, die geeignet waren, diverse spezifische Strukturen in der Zahnentwicklung aufzuzeigen. In unserem zentralen Tierstall wurden die spezifischen Mausstadien durch gezielte Verpaarung zu festgelegten Zeitpunkten gezüchtet. Mittels Plaquekontrolle wurde am folgenden frühen Morgen die Insemination festgestellt, wonach der jeweilige Termin zur Gewinnung der Embryonalstadien bei bestehender Schwangerschaft und damit zum Erhalt der korrekten Entwicklungsstadien der Zahnanlagen der Mausfoeten festgelegt werden konnte. Die Zahnstadien zeigten das Zahnleisten-, Knospen-, Kappen-, frühes und spätes Glockenstadium, (Differenzierungs- und Sekretionsphasen). Die adulten Molare der 3 Monate alten Mäuse wurden mit für die Untersuchung des peroxisomalen Kompartiments in fertig ausdifferenzierten Zahngewebe (ohne Ameloblasten) verwendet. Damit diese adulten Zähne mit dem Mikrotom geschnitten werden konnten, mussten sie entkalkifiziert werden, was nach Romeis (1989) auch nach einer Entkalkungsperiode von ca. 4 Wochen in EDTA-Lösung abgeschlossen sein sollte. Um den Entkalkungsgrad der erwendeten Präparate festzustellen standen nach Literaturangaben drei Alternativen zur Verfügung: 1) manuelle Methode, 2) Röntgen und 3) Volumen-CT (V-CT) (Obert et al 2005). In dieser Dissertation wurde die manuelle Methode und die Kalkdichtebestimmung im V-CT verwendet. Im Gegensatz zu der Beschreibung von Romeis (1989), zeigten die eigenen Versuche und Vergleiche mit Erfahrungen aus Knochendichtemessungen, dass die Mause Zähne erst nach 6 Wochen vollständig entkalkifiziert waren. Alle anderen Zahnstadien ließen sich auch ohne Entkalkifizierung schneiden (P3 allerdings relativ schwierig). Obwohl 4 Mauseköpfe in Serien geschnitten wurden, konnten die Anfangsstadien der Zahnleisten im Stadium E13.5 nicht mit vollkommender Sicherheit identifiziert werden. Vermutlich war die Orientierung der Köpfe in den Paraffinblöcken, zur Darstellung der kleinen Zahnleiste, nicht optimal geeignet. Im Gegensatz hierzu, waren in den anderen Zahnstadien Zahnglocke, Zahnkappe und auch die Zahnleisten sehr gut zu identifizieren, weshalb bei Immunfärbungen die Verteilung der peroxisomalen Antigene diesen Strukturen sehr gut zugeordnet werden konnte.

## **5.2. Methodische Aspekte zum Nachweis peroxisomaler Proteine oder entsprechender mRNAs in Zahngeweben**

### **5.2.1. Antigenwiederherstellung („Antigen retrieval“)**

Zur Detektion peroxisomaler Proteine wurde die Methode nach Grabenbauer et al (2001) modifiziert und speziell für die Zahngewebe angepasst, bei der enzymatisch mit Trypsin vorbehandelte formalin-fixierte Paraffinschnitte eingesetzt wurden. Generell kann durch Paraformaldehyd-Fixierung in Verbindung mit der Paraffineinbettung die Antigenizität des Gewebes durch die Maskierung von Epitopen und die Veränderung der Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine sehr stark reduziert werden (Boenisch 2006; Montero 2003; Werner et al 1996). Um die antigenen Epitope freizulegen werden deshalb verschiedene Techniken zur Vorbehandlung der Schnitte angewendet. Die klassische Methode ist dabei der enzymatische Andau mit Enzymen, wie Trypsin, Pronase oder Pepsin. Hierbei werden die Eiweißvernetzungen aufgebrochen, die durch das Paraformaldehyd erzeugt wurden. Einige wenige Antigene können jedoch durch eine enzymatische Vorbehandlung zerstört werden und wären dann nicht mehr nachweisbar. Die Zeitdauer des enzymatischen Verdaues wird durch die Wahl der ursprünglich verwendet Fixierungs- und Einbettungsbedingungen bestimmt (Stärke und Dauer der Fixierung, sowie Paraffineinbettungstemperatur) und ist ebenso von der Molarität, Zusammensetzung und dem pH-Wert des für die Vorbehandlung verwendeten Puffers abhängig. Der wichtigste Faktor ist jedoch das nachzuweisende Antigen selbst und der dafür verwendete spezifische Antikörper.

Eine Ergänzung und Alternative zum enzymatischen Verdau stellt die Mikrowellenbehandlung der Schnitte mit verschiedenen Puffern, z.B.Citratpuffer dar. Die Einwirkung von Hitze, entweder durch Kochen, durch Autoklavieren oder durch die Mikrowellenbehandlung mit anschließender langsamer Abkühlungsphase, bietet den nachhaltigsten Effekt auf die strukturelle Rückfaltung von Proteinen (Boenisch 2006; Grabenbauer 2001; Montero 2003; Werner et al 1996).

Zum Nachweis von Peroxisomen im Zahngewebe erwies sich die Kombination aus einem leichten Trypsin-Andau mit nachfolgender Mikrowellenbehandlung in Citratpuffer (pH 6.0) in den eigenen Untersuchungen als hervorragend geeignet. Durch den enzymatischen Andau mit Trypsin allein konnte nur ein schwaches und diffuses Katalase-Signal in Zahngeweben beobachtet werden. Erst die kombinierte Prozessierung mit anschließender Mikrowellenbehandlung ermöglichte die eindeutige Immundetektion in jedem der einzelnen

Zahngewebe. Auch Grabenbauer et al (2001) beschrieben, dass selbst in peroxisomenreichen Geweben, wie Leber, Darm und Niere, erst die Kombination dieser Methoden zu einer Detektion der Peroxisomen als abgrenzbare individuelle Organellen führt.

Die Zeit des Trypsinverdaues und die Trypsinkonzentration war hierbei unbedingt einzuhalten (10 min. mit 0,01% Trypsin bei 37°C). Ein zu langer Andau oder zu lange Mikrowellenbehandlung führte zu einer kompletten Zerstörung der sehr sensiblen Anteile des Zahngewebes (wie z.B. der Zahnpulpa). Eine zu kurze Trypsinbehandlung ermöglichte kaum Peroxisomendetektion als punktförmige Organellen, sondern erbrachte nur leichte diffuse zytoplasmatische Anfärbungen.

Trotz gleicher Schnittdicke bei identischem Gewebe und der gleichen Andauzeit schien die Penetration derselben Antikörper an die Bindungsstellen auch bei zusätzlicher Mikrowellenbehandlung unterschiedlich zu verlaufen. Es musste also noch einen weiteren Faktor geben, der die Färbungen beeinflusste. Wie sich herausstellte, war dieser Faktor die Qualität der Perfusionsfixierung: Je besser die Perfusionsfixierung der Gewebe war, desto mehr Quervernetzungen der Proteine waren vorhanden und umso länger musste der Verdau durchgeführt werden. Erst die optimale Perfusionsfixierung ermöglichte eine sehr gute Strukturhaltung mit homogener punktförmiger Lokalisation der Peroxisomen in den verschiedenen Zahngeweben.

### **5.2.2. Antikörper-Spezifität und –Sensitivität**

Die optimale Antikörper-Konzentration wurde mittels Verdünnungsreihen ermittelt. Als beste Konzentration der anti-peroxisomalen Erstantikörper erwies sich in der Regel eine Verdünnung von 1:1000. Eine höhere Antikörper-Konzentration ergab zusätzlich zur Detektion des Antigens der Peroxisomen, eine unspezifische Hintergrundreaktion anderer Gewebsbestandteile. Eine zu hohe Verdünnung ließ keine Detektion der Peroxisomen zu. Optimal wurden die Färbungen bei richtiger Antikörperkonzentration in Kombination mit sehr dünnen Schnitten (2 µm), weil in diesen Präparaten individuelle Peroxisomen besonders gut aufgelöst werden konnten und eine niedrige Hintergrundreaktion vorhanden war.

Unspezifische Anfärbungen der Gewebeschnitte können durch eine Reihe von Fehlern an verschiedensten Protokollschritten hervorgerufen werden. So kann eine mangelhafte Entparaffinierung, ein überlanger Verdauungs- und Demaskierungsschritt zu unspezifischen Anfärbungen führen. Ebenso dürfen die Schnitte keinesfalls austrocknen, weil ansonsten die Antikörperlösung unspezifisch auf dem Schnitt festgehalten wird. Die häufigste Art der

unspezifischen Anfärbung wird durch eine nicht gewollte, zusätzliche Bindung eines eingesetzten Antikörpers an andere Protein-Strukturen im Gewebe, oft im Bindegewebe, hervorgerufen. Um die Spezifität der immunhistologischen Färbung zu kontrollieren müssen daher verschiedene Kontrollen durchgeführt werden. Um eventuelle Unspezifitäten des sekundären Detektionssystems nachzuweisen, sollten Negativkontrollen ohne den Primärantikörper in Parallelschnitten, jedoch mit identischen sekundären Nachweisschritten durchgeführt werden. Unter den oben genannten Bedingungen waren die Negativkontrollen immer sehr sauber, was für die Qualität und Spezifität der etablierten Methode spricht. Die Spezifität und Sensivität aller in der Dissertation verwendeten Primärantikörper wurden bereits in verschiedenen Studien mit anderen Geweben in unserer Arbeitsgruppe ausgetestet. Im ZNS: (Ahlemeyer et al 2007), im Hoden: (Nenicu et al 2007), in der Lunge: (Karnati und Baumgart-Vogt 2008).

### **5.2.3. Methoden zum selektiven Nachweis von zellspezifischen mRNAs in Zahngewebe**

Ribonukleinsäure (RNS) wurde 1931 von Branchet in der tierischen Zelle nachgewiesen. Durch grundlegende Arbeiten konnte jedoch erst mehr als 25 Jahre später gezeigt werden, wie wichtig die RNA (bzw. auf Deutsch RNS) für die zelluläre Eiweißsynthese und den Ablauf der Kernteilungsvorgänge ist (Hall und Spiegelman 1961; Hermann 1956; Nirenberg und Matthaei 1961; Nomura und Takemori 1960; Volkin et al 1958). Die intrazelluläre RNA-Menge steht im direkten Zusammenhang mit der Intensität der Stoffwechselvorgänge zu stehen und bildet diesbezüglich einen wertvollen Indikator für die metabolische Aktivität unterschiedlicher Zelltypen. Die Menge und die Verteilung der RNA (vermutlich der ribosomalen RNA) wurde bereits von Hermann auch im Laufe der Zahnentwicklung untersucht und hat zum Verständnis der Entstehung der Schmelzdefekte beigetragen (Hermann 1956). Hermann verwendete dafür die Methylgrün-Pyronin-Färbungen nach Unna. Hiermit konnte er eindeutig nachweisen, dass Amelo- und Odontoblasten während der Zahnentwicklung unterschiedlich sekretorisch aktiv sind. RNA-Moleküle können intrazellulär unterschiedliche Funktionen ausüben (Knippers 2006). Zum einen kann RNA genetische Information übertragen (=mRNA). Andere RNA-Moleküle tragen zur Übersetzung dieser Information in Proteine bei (=tRNA und rRNA). Darüber hinaus kann RNA auch katalytische Funktionen ähnlich einem Enzym innehaben (small nuclear RNA=snRNA zum Spleißen oder small nucleolar RNA=snoRNA zum prozessieren der rRNA). Die für die Proteinsynthese wichtigen RNAs sind:



a) die mRNA (messenger RNA) kopiert die auf der DNA kodierte Gensequenz und trägt sie nach dem Spleißen weiter zu Ribosomen im Cytoplasma, wo mit Hilfe dieser Information die Biosynthese spezifischer Proteine stattfinden kann (Knippers 2006). Jeweils drei im Leseraster des Polynukleidstrang nebeneinander liegende Nukleotide bilden ein Codon, mit dessen Hilfe sich eine spezifische Aminosäure, die in ein Protein eingebaut werden soll, eindeutig bestimmen lässt. Dieser Zusammenhang wurde 1961 von Nirenberg und Matthaei beschrieben.

b) die tRNA (transfer RNA) kodiert keine genetische Information, sondern dient als Hilfsmolekül bei der Proteinbiosynthese, indem sie einzelne Aminosäuren aus dem Cytoplasma bindet und zum Ribosom transportiert, mit dem entsprechenden Anticodon an die mRNA andockt und somit die entsprechende Aminosäuresequenz in entsprechenden Proteinen determiniert (Knippers 2006).

c) die rRNA (ribosomale RNA), trägt ähnlich wie die tRNA, keine genetische Information, sondern ist am Aufbau des Ribosoms beteiligt und ist bei der Knüpfung der Peptidbindung auch katalytisch aktiv (Knippers 2006).

Für unsere Untersuchungen war hauptsächlich der Nachweis spezifischer mRNAs im Zahngewebe von Interesse, weil diese die metabolischen Funktionen der verschiedenen Zelltypen kodieren. mRNA macht ungefähr 2% der Gesamt-RNA aus.

Grundsätzlich gibt es verschieden Möglichkeiten heterogen exprimierte spezifische mRNAs, in diesem Falle mRNAs peroxisomaler Proteine und entsprechender „zelltypisch-spezifischer Marker“, nachzuweisen:

1) Eine Möglichkeit wäre morphologisch über in situ Hybridisierung mRNA darzustellen (Grabenbauer 2001). Diese Methode gestaltet sich in Zahngeweben aber als überaus schwierig wegen starker Vorbehandlungsnotwendigkeit zur Freilegung der im Schnitt fixierten mRNAs, die zu schweren Artefakten der Zahnstruktur im Paraffinschnitt führt. Bei schwächerer Vorbehandlung des Gewebes ist die Sensitivität des in situ Hybridisierungsverfahrens entsprechend herabgesetzt – ähnlich wie beim Proteinnachweis (Grabenbauer 2001; Schad et al 1994).

2) Eine andere Methode wäre spezifische mRNAs über RT-PCR aus isolierter Gesamt-RNA aus frisch präparierten und isolierten Einzelzellen nachzuweisen. Grundvoraussetzung zur Untersuchung der spezifischen mRNA Expression in unterschiedlichen Zelltypen ist die Reinheit der isolierten Zellpräparation. Außerdem können bei diesem Isolierungsverfahren

aus Zähnen auch nur geringe Mengen an Zellen gewonnen werden. Durch die anschließend notwendige Vermehrung über die Herstellung von primären Zellkulturen, würden Odontoblasten oder Ameloblasten jedoch dedifferenzieren und damit ihr Expressionsmuster verändert werden (Hoffmann et al 2001).

3) Deshalb ist die beste Alternative die Durchführung einer Mikrodissektion zur hochreinen Isolierung von Zelltyp-spezifischer RNA mit anschließender RT-PCR. Hierbei erreicht man auch einen maximal sensitiven Nachweis spezifischer und schwächer exprimierter mRNAs. Daher wurde von uns diese Methode zum Nachweis der Expression zellspezifischer RNAs favorisiert. Hierzu wurde unfixiertes, gefrorenes Material verwendet (2 Tage alte Mauseköpfe). Paraffineingebettetes und fixiertes Material eignet sich dagegen schlechter, weil die mRNAs im Schnitt fixiert sind, deshalb durch starke Vorbehandlung freigelegt werden müssen und meist bei der Isolierung fragmentieren. Damit ist die RNA- Qualität, die man aus Paraffinschnitten isolieren kann, immer wesentlich schlechter für die sich anschließende RT-PCR geeignet. Bis jetzt gibt es nur sehr wenige Untersuchungen zur Microdissektion von Zahngewebe (Hoffmann et al 2001; McLachlan et al 2003). Vielmehr wurde diese Methode sehr häufig in der Krebsforschung eingesetzt (Badea et al 2008; Sasano et al 2009). Das man RNA aus mikrodisektiertem Zahngewebe isolieren kann wurde in der Arbeit von Hoffmann et al. 2001, durch Nachweis der mRNA-Expression von Kollagen, Dentinsialophosphoprotein (=DSPP) und Osteocalcin (=OC) in verschiedenen Altersstadien mikrodisektierter Osteoblasten nachgewiesen. Auch diese Arbeitsgruppe beschreibt, dass die Mikrodissektion die beste Möglichkeit ist, um eine homogene Population eines Zelltyps zu isolieren und deren RNA-Gehalt zu untersuchen (Hoffmann et al 2001).

Mikrodissektion in Kombination mit RT-PCR wurde weiterhin von McLachlan und Mitarbeitern verwendet, um Odontoblasten und die Zellen der benachbarten Zahnpulpa auf die Expression von DSPP-, Nestin-, Kollagen- 1alpha und -3alpha-mRNAs zu untersuchen (McLachlan et al 2003). Hoffmann und Kollegen brauchten zur Isolierung von etwa 120 ng Gesamt-RNA ca. 50-60 Odontoblasten (Hoffmann et al 2001). Deshalb wurden in dieser Dissertation jeweils ca. 80 Zellen der Amelo- und Odontoblasten ausgeschnitten, um den Nachweis von 5 verschiedenen mRNAs peroxisomaler Proteine zu ermöglichen.

Die Ergebnisse dieser Dissertation erbrachten, dass die entsprechenden RNAs aller untersuchten peroxisomalen Proteine im Zahngewebe über RT-PCR semiquantitativ nachweisbar waren.

In der Studie von McLachlan und Kollegen wurde die Nested-PCR-Methode angewandt, die in der Regel zu einer größeren Menge spezifischen Produktes führte (McLachlan et al 2003). Für meine Ergebnisse war jedoch eine normale RT-PCR über 35 Zyklen ausreichend, was möglicherweise auf eine bessere mRNA-Konservierung in dem mikrodisezierten Material oder auf verbesserte Isolierungsmethoden von Mikromengen RNA (MicroRNA Kit, Qiagen) zurückzuführen ist.

Die durch RT-PCR gewonnenen Ergebnisse auf RNA-Ebene unterschieden sich von den morphologischen Befunden auf Proteinebene. Während in den morphologischen Ergebnissen Katalase kaum in der Differenzierungs- und Sekretionsphase in den Ameloblasten nachzuweisen war, scheint nach den RT-PCR Ergebnissen zu schliessen, die Katalase-mRNA jedoch in den Ameloblasten vorzuliegen. Zur Erklärung dieses Unterschiedes kommen zwei Möglichkeiten in Betracht:

- a) Selbst die sensitive Immunfluoreszenzmethode zum Proteinnachweis hat eine Detektionsschwelle, unter der niedrigere Proteinmengen nicht nachgewiesen werden können. Dies könnte nur durch Signalamplifikation der Immunfluoreszenzreaktion verändert werden, z.B. durch catalyzed reporter deposition (CARD), auch Tyramid-Signal-Amplifikation (TSA) genannt (Grabenbauer et al 2001).
- b) Die vorhandene mRNA für Katalase könnte als Reservoir für bestimmte Notfallsituationen in Ameloblasten vorhanden sein, jedoch nur wenig translatiert werden.

Der exakte Mechanismus zur Erklärung dieser Diskrepanz muss in zukünftigen Studien abgeklärt werden.

### **5.3. Studien aus der Literatur zu Peroxisomen im Zahngewebe**

Mitte der 50er Jahre des letzten Jahrhunderts wurden die Peroxisomen als erstes in der Niere und der Leber als „Microbodies“ nachgewiesen (Gansler und Rouiller 1956; Rhodin 1955). Obwohl diese Organelle bereits vor über 50 Jahren entdeckt wurde, wurden ihre Proteinzusammensetzung und metabolische Funktionen erst in neuester Zeit aufgeklärt (Völkl et al 1998). Im Laufe der Zeit hat sich weiterhin herauskristallisiert, dass Peroxisomen in verschiedenen Geweben sehr heterogene Funktionen ausführen (Baumgart 1997).

Genug Studien bewiesen, dass die Peroxisomenaufgaben in unterschiedlichen Geweben vielfältig sind (Grabenbauer 2001; Lazarow 1987; Mooradian und Cutler 1978)(M.Grabnbauer et al 2001, Lazarow 1987, Mooradian und Cutler 1978) und vom Stoffwechsel der Zelltypen abhängen (Karnati und Baumgart-Vogt 2008; Nenicu et al 2007).

Bis heute wurden viele Arbeiten zu der Funktion und Biogenese dieser Organellen in Hefemodellen oder Lebergewebe durchgeführt (Yokota und Fahimi 2009). Mein Ziel war jedoch Zahngewebe nach Peroxisomenvorkommen zu analysieren und deren Funktion in diesen speziellen Zelltypen zu beschreiben. Bis jetzt wurde das Vorkommen der Peroxisomen in Zahngeweben nur in einem kurzen Satz in dem Buch von Provenza (1988) in Odontoblasten erwähnt. Über deren Funktion und das Vorkommen dieser Organellen in anderen spezifischen Zelltypen der Zahngewebe war jedoch noch nichts bekannt. Meine Untersuchungen zeigten, dass die Peroxisomen in allen Zahngeweben vorkommen, dass jedoch deren Anzahl insgesamt niedriger ist, als zum Beispiel in Hepatozyten der Leber oder in den Speicheldrüsen. Weiterhin wurde in dieser Dissertation nachgewiesen, dass die Enzymzusammensetzung in den verschiedenen Zahngewebetypen stark variiert. Unsere Befunde zur Heterogenität der peroxisomalen Enzyme in unterschiedlichen benachbarten Zelltypen sind nicht ungewöhnlich, sondern werden durch ähnliche Befunde in anderen Gewebearten (wie z.B. Neurone versus Gliazellen im ZNS oder somatische Zellen versus Keimzellen des Hodens) bestätigt (Ahlemeyer et al 2007; Nenicu et al 2007).

Da peroxisomale Erkrankungen eindeutig mit Störungen der Zahnentwicklung einhergehen, ist jedoch bewiesen (Poll-The et al 2004), dass die Peroxisomen eine Rolle in der Zahnentwicklung spielen müssen, deren genaue Funktionen jedoch bis heute unbekannt sind.

So zeigten Patienten mit milderer Ausprägung von peroxisomalen Biogenesestörungen durch PEX1-Gendefekt (siehe auch Kapitel 2.1.2) einen deutlich verzögerten Zahndurchbruch und wiesen Zahnfehlstellungen und Schmelzhypoplasien auf (Poll-The et al 2004). Aus diesem Grund wurden in meiner Dissertation auch Versuche mit einem Knockout-Mausmodell für eine peroxisomale Biogenesestörung, der Pex11 $\beta$ -KO-Maus mit defekter Peroxisomenproliferation, durchgeführt.

#### **5.4. Ausprägung des peroxisomalen Kompartiments in verschiedenen Zahngeweben**

Grundsätzlich konnten in dieser Arbeit Peroxisomen in allen unterschiedlichen Zahngeweben nachgewiesen werden. Diese unterschieden sich jedoch in a) der Größe, b) der Form und Ausprägung, c) der Enzymzusammensetzung.

Das peroxisomale Kompartiment wurde im Speziellen in Ameloblasten, Odontoblasten, Stratum intermedium, Zahnpulpa und Schmelzpulpa näher charakterisiert.

#### **5.4.1. Nachweis der Ubiquität der Peroxisomen im Zahngewebe über Antikörper gegen die Biogeneseproteine Pex13p und Pex14p in der Peroxisomenmembran**

Der beste und homogenste Nachweis der Peroxisomen im Zahngewebe wurde mit Antikörpern gegen Pex13p und Pex14p erreicht, vermutlich weil diese Proteine Biogeneseproteine darstellen und Biogenese der Peroxisomen in allen Zellen stattfindet. Pex13p und Pex14p sind als Dockingproteine auf der Peroxisomenmembran für den Import peroxisomaler Matrixproteine zuständig. Matrixproteinimport in Peroxisomen beinhaltet 1) die Synthese von neuen Matrixproteinen an freien Ribosomen im Cytoplasma, 2) die Erkennung der Targeting-Signale (PTS1 und PTS2) der Proteine durch zytosolische Rezeptoren (Pex5p und Pex7p), desweiteren 3) Bindung der Shuttle-Rezeptoren an Pex13p und Pex14p im Dockingkomplex der Peroxisomenmembran, 4) die Translokation durch die Membran und 5) die Abgabe der Ladung (=Matrixproteine) in die Organellenmatrix sowie das Recycling der Shuttle-Rezeptoren (Schell-Steven et al 2005).

Sie gehören zur Gruppe der Peroxin-Proteine, d.h. peroxisomale Biogeneseproteine, von denen bis heute 32 verschiedene Mitglieder identifiziert worden sind (siehe Einleitung). Besonders in Präparationen mit Pex14p-Markierungen wiesen alle Peroxisomen ein sehr starkes Fluoreszenzsignal auf und wurden als „große“ runde Organellen sichtbar. Im Vergleich dazu wurden die Fluoreszenzsignale in Pex13p-Präparationen schwächer ausgeprägt und wiesen scheinbar „kleinere“ Organellen mit jedoch ähnlicher Verteilung und Form auf. Diese Unterschiede sind vermutlich auf die verschiedenen Proteinmengen von Pex13p und Pex14p auf der Peroxisomenmembran zurückzuführen. Auch im Hodengewebe wurden starke Unterschiede im Vorkommen dieser beiden Dockingkomplex-Peroxine bereits beschrieben (Nenicu et al 2007). Allerdings wiesen dort beide Proteine auch verschiedene Verteilungsmuster in unterschiedlichen Zelltypen (Pex13p vermehrt in Keimzellen versus Pex14p vermehrt in Sertolizellen) auf. Durch die intensive Markierung der Peroxisomen unterschiedlicher Zahngewebe durch anti-Pex14p-Antikörper, konnte dieser auch für lichtmikroskopische immunhistochemische Übersichtspräparate mit der ABC-Peroxidase-Technik zur Visualisierung der Peroxisomen, sowie zur Bestimmung der Peroxisomenzahl und deren Verteilung in Zahngeweben herangezogen werden. In den Pex14p-Färbungen wurde deutlich, dass a) Peroxisomen in allen Zellen der Zahngewebe vorhanden sind, b) das peroxisomale Kompartiment abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen verschieden ausgeprägt ist, c) ihre intrazelluläre Verteilung Besonderheiten aufweist und d) sie vorzugsweise in höchster Anzahl jedoch im fortsatznahen Cytoplasma der Amelo- und

Odontoblasten vorhanden waren. In Immunfluoreszenz-Doppelmarkierungen mit Antikörpern gegen verschiedene Intermediärfilamentproteine und anti-Pex14p konnte weiterhin eine starke Assoziation der Peroxisomen mit diesem Filamentsystemen in Ameloblasten und Odontoblasten gezeigt werden (für die Diskussion hierzu siehe Kap.:5.4.6.).

Da Pex 14p als bester Marker für alle Peroxisomen in Zahngeweben identifiziert werden konnte, wurde der entsprechende Antikörper auch für Studien an Pex11 $\beta$ -KO-Mäusen mit einem Defekt in der Peroxisomenvermehrung in dieser Dissertation eingesetzt ( siehe Kapitel 4.3.7.). Im Gegensatz zu den homogenen Pex14p-Färbungen, wiesen Präparationen zum Nachweis von Stoffwechselenzymen, z.B. Katalase, je nach Zelltyp starke Variationen auf und zeigten eine heterogene Enzymverteilung in der Peroxisomenpopulation (z.B. wenig Katalase in ausdifferenzierten Ameloblasten versus viel Enzym in Odontoblasten). Studien in anderen Organsystemen erbrachten ähnliche Ergebnisse in Bezug auf die Heterogenität der Peroxisomen (Ahlemeyer et al 2007; Nenicu et al 2007). Die Heterogenität der peroxisomalen Stoffwechselenzyme und Lipidtransporter wird in späteren Kapiteln (Kapitel 5.5.) unter den entsprechenden Stoffwechselwegen in Peroxisomen und deren speziellen Funktion in Zahngeweben ausführlich diskutiert.

#### **5.4.2. Ausprägung des peroxisomalen Kompartiments in unterschiedlichen Zahn- und Zelldifferenzierungsstadien**

In den Ergebnissen mit Pex14p-Färbungen kam klar zum Ausdruck, dass das peroxisomale Kompartiment während der Zahnentwicklung und Zelldifferenzierung starken Veränderungen unterliegt. Während in E15.5-E18.5-Zahnstadien relativ wenige Peroxisomen gleichmäßig in allen Zellen verteilt waren, trat mit zunehmenden Reifungsstadien der Zähne und spezifischer Ausdifferenzierung der Zahngewebe eine bevorzugte Lokalisation dieser Organellen in den Zellfortsätzen der sezernierenden Amelo- und Odontoblasten auf. Eine ähnliche differenzierungsabhängige Ausprägung des peroxisomalen Kompartiments wurde im Rahmen der Entwicklung von Zellen des Darmepithels entlang der Krypten-Villus-Achse (Roels et al 1991) und während der Ontogenese und der Ausdifferenzierung unterschiedlicher Darmabschnitte und der Hepatozyten beschrieben (Baumgart et al 2003; Grabenbauer 2001). Auch im Rahmen der Arbeit von Grabenbauer et al (2001) wurde eine signifikante Zunahme der Peroxisomen mit zunehmendem Entwicklungsgrad der Mäuse in ungeborenen Tieren im Vergleich zu Embryonen unterschiedlichen Alters festgestellt. Weitere Studien an Hepatomzellen bewiesen, dass mit zunehmenden Differenzierungsgrad von HepG2-Zellen in Kultur (z.B. nachgewiesen durch Ausbildung von Gallenkapillaren und der Expression

spezifischer Enzyme in Peroxisomen) eine zunehmende Maturierung des peroxisomalen Kompartiments auftrat (Stier et al 1998). Von den Autoren wurde diese Veränderung auf die erhöhten Mengen und vermehrte Wirkung von PPARalpha, einem nukleären Rezeptor zur Regulation vieler Gene peroxisomaler Proteine zurückgeführt (siehe hierzu auch Kapitel 5.5.3.). Abschließend zeigten auch Studien an Knockoutmäusen mit Peroxisomendefekt, dass eine vermehrte Wachstumsretardierung erst im letzten Drittel der Schwangerschaft als Phänotyp bei diesen Mäusen auftrat (Stier et al 1998).

Aufgrund der eigenen Befunde und den Ergebnissen in der Literatur ist davon auszugehen, dass Peroxisomen eine entscheidende Rolle im Stoffwechsel hoch ausdifferenzierter Zellen spielen, so auch in sezernierenden Amelo- und Odontoblasten. Besondere Unterschiede in peroxisomalen Stoffwechselenzymen fielen gerade auch bei diesen Zelltypen auf (siehe Kapitel 5.5.).

#### **5.4.3. Relation der Peroxisomen zu Intermediärfilamenten in Zahngewebe**

Bei der Entwicklung des Zahnes finden viele epithelial-mesenchymale Interaktionen statt. Die Zahnleiste und das Schmelzorgan stammen von den Epithelzellen ab und können deshalb auch über Cytokeratinmarker nachgewiesen werden, während Odontoblasten aus dem Mesenchym rekrutiert werden und deshalb Vimentinfilamente besitzen. Somit können diese Marker sehr gut für die Charakterisierung der verschiedenen Zahnstadien und Zelltypen benutzt werden (Domingues et al 2000; Lombardi et al 1992).

Cytokeratin (14, 26) oder Vimentin sind spezifische Intermediärfilamente in Ameloblasten bzw. Odontoblasten (Josephsen et al 1999; Ravindranath et al 2001). In dieser Dissertation wurden Antikörper gegen diese Marker verwendet, um die verschiedenen Zelltypen in Doppelimmunfluoreszenzpräparaten mit anti-Pex14p-Antikörpern eindeutig zu identifizieren und nachzuprüfen, wo die Peroxisomen intrazellulär lokalisiert sind. Die Ergebnisse erbrachten, dass die Peroxisomen häufig an den markierten Intermediärfilamenten nachzuweisen waren. Auch in anderen Studien wurde ebenfalls beschrieben, dass Vimentinfilamente verschiedene Zellorganellen an ihrem Ort halten (Lombardi et al 1992). Für die Ameloblasten wurde ähnliches gezeigt. Auch Schmelzmatrixproteine, wie Amelogenin, wurden direkt am Cytokeratin 5 oder 14 nachgewiesen (Ravindranath et al 2003; Ravindranath et al 2001). Nanci und Mitarbeiter konnten durch Elektronenmikroskopie zeigen, dass das Amelogenin in sekretorischen Granula in Ameloblasten lokalisiert ist, welche immer in der Nähe der Cytokeratinfilamente vorhanden waren (Nanci et al 1985).

Vermutlich werden Peroxisomen an den Filamenten in unterschiedlichen Abschnitten von bestimmten Zellarten (wie z.B. in dem fortsatznahen Cytoplasma von Amelo- und Odontoblasten) fixiert, um dort ihre metabolische Funktion auszuüben. Dafür spricht auch, dass in *in vivo* Experimenten Peroxisomen zu 95% unbeweglich in den Zellen lokalisiert vorkommen, während nur ca. 5% entlang der Mikrotubuli aktiv zu anderen Zellarealen transportiert werden (Schrader und Fahimi 2006a; Subramani 2002; Wiemer et al 1997).

## **5.5. Heterogenität verschiedener peroxisomaler Stoffwechselwege in unterschiedlichen Zahngeweben**

### **5.5.1. Peroxisomale Katalase zum Schutz gegen oxidativen Stress in Zahngeweben**

Wasserstoffperoxid entsteht im menschlichen Organismus als natürlicher Bestandteil bei verschiedenen Stoffwechselvorgängen. Peroxisomen haben – wie bereits in der Einleitung erwähnt – kein Elektronentransportsystem zur Energiegewinnung, weshalb  $O_2$  über verschiedene Oxidoreduktasen (peroxisomale Oxidasen) unter Substratoxidation zu  $H_2O_2$  reduziert wird (De Duve 1965; De Duve und Baudhuin 1966). Weiterhin sind intrazelluläre Superoxid Dismutasen (SODs) Enzyme, die über Umsetzung des Superoxidradikals Wasserstoffperoxid herstellen. Sie kommen u.a. im Cytoplasma und in Peroxisomen (CuZnSOD=SOD1), sowie in den Mitochondrien (MnSOD=SOD2) oder extrazellulär (SOD3) vor. Das intrazelluläre, durch SOD entstehende  $H_2O_2$ , wird durch Katalase, Peroxiredoxine oder Glutathion-Peroxidasen in unterschiedlichen Zellkompartimenten abgebaut. Die verschiedenen lokalisierten Isoenzyme der Glutathion-Peroxidasen reduzieren Wasserstoffperoxid, in dem Energie und Elektronen der reaktiven Peroxide zu einem kleinen schwefelhaltigen Molekül, dem Glutathion, abgegeben wird. Das Enzym mit der größten Fähigkeit zum  $H_2O_2$ -Abbau ist jedoch die in Peroxisomen enthaltene Katalase (De Duve 1965; De Duve und Baudhuin 1966). Neuerdings wurde festgestellt, dass diese Zellorganellen zusätzlich zur Katalase eine ganze Reihe von weiteren  $H_2O_2$ -abbauenden Enzymen besitzen, wie z.B. ein Isoenzym der Glutathion-Peroxidase SOD1 und die Peroxiredoxine 1, 5 und 6 (Immenschuh et al 2003; Schrader und Fahimi 2006b). Aufgrund der Fähigkeit von  $H_2O_2$  zur Hydroxylradikalbildung durch die Reaktion mit Eisen (Fenton-Reaktion) gilt es als Zellgift und muss deshalb rasch enzymatisch durch Peroxidasen oder Katalase abgebaut werden. Wenn  $H_2O_2$  akkumuliert, können durch Hydroxylradikalbildung Proteine, Nuklein- und Fettsäuren geschädigt werden (Boveris et al 1972). Zusätzlich erfüllt  $H_2O_2$  jedoch eine wichtige Abwehrfunktion bei der Peroxidation von bakteriellen Membranlipiden, während der Phagozytose durch Makrophagen und anderen Abwehrzellen (Löffler et al 2006). Weiterhin



scheint  $H_2O_2$  eine wichtige Rolle der „metabolischen Signalgebung“ (metabolic signalling) durch Veränderung des Intermediärstoffwechsels zu spielen (Masters 1996).

Verschiedene Studien zeigen, dass auch bei umgebungsbedingtem Stress an Zähnen, z.B. durch mechanischen, physikalischen oder chemischen Stress (durch Zug, UV-Lampen, Kavitätenpräparation,  $H_2O_2$ -Bleichung oder Haftvermittler), reaktive Sauerstoffspezies („Reactive oxygen species“=ROS) in Zahngeweben stark ansteigen und somit die Zellen schädigen können (Spagnuolo et al 2004). Andere Studien zeigten auch, dass sobald verschiedene Zelltypen Stress ausgesetzt sind, der Glutathionspiegel auf sublethale Dosen steigt (z.B. Odontoblastenreaktion mit Kunststoffen oder Haftvermittler) (Noda et al 2005).

In der Literatur gibt es bisher kaum Information zu ROS oder antioxidativen Enzymen während der Zahnentwicklung. Sauerstoffradikale in der Zahnentwicklung wurden nur im Zusammenhang mit Vitamin A beschrieben. Und zwar kommt es zu Entwicklungsstörungen von Knochen und Zähnen, wenn dieses Vitamin nicht in ausreichenden Mengen zugeführt wird. In Abwesenheit von Vitamin A werden vermehrt ROS gebildet. Vitamin A spielt – ebenso wie Vitamin E – eine bedeutende Rolle als Antioxidans (Schwarz et al 1997). Es tritt als Radialfänger auf und nimmt den aggressiven Sauerstoffradikalen somit ihre schädliche Wirkung. Darüber hinaus ist Vitamin A für die Regelung der normalen Zellteilung und –erneuerung, sowie das Wachstum der Gewebe und intakte Schleimhäute verantwortlich. Ähnlich wie Vitamin A oder E wirken Plasmalogene, Etherlipide mit einer reaktiven Vinyletherdoppelbindung, an die auch ROS angelagert werden können (Brites et al 2004). Diese Lipide werden wie weiter unten beschrieben in Peroxisomen synthetisiert (siehe Kapitel 5.5.2.), so dass ein zusätzlicher ROS-detoxifizierender Mechanismus durch diese Organellen gesteuert wird. Zur Lokalisation der antioxidativen Enzyme wurde in dieser Dissertation nur der anti-Katalase-Antikörper verwendet, weil alle anderen antioxidativen Proteine in zu niedrigen relativen Mengen in Peroxisomen vorkommen oder multikompartimentell lokalisiert sind und nicht durch Immunhistochemie in einem punktförmigen Verteilungsmuster in Zahngeweben sichtbar gemacht werden konnten (eigene, nicht Abbildungen-integrierte Befunde). Auch Grabenbauer und Kollegen haben festgestellt, dass bei zu niedriger Expression von unterschiedlichen Proteinen in Peroxisomen, kein Organellenmuster mehr nachzuweisen war (Grabenbauer et al 2001). Jedoch trat hierbei aber eine diffuse Hintergrundreaktion im Cytoplasma der entsprechenden Zellen auf (Grabenbauer 2001). In dieser Dissertation war in den Odontoblasten und im Stratum intermedium eindeutig Katalase in großen Mengen in Peroxisomen nachzuweisen. Im Gegensatz dazu war in

ausdifferenzierten Ameloblasten nur eine leichte, diffuse Katalasereaktion vorhanden. Diese Ergebnisse konnten auch mit der sensitiveren Immunfluoreszenzmethode verifiziert werden. Auch hier waren keine eindeutigen punktförmigen Organellen in sezernierenden Ameloblasten mit dem anti-Katalase-Antikörper nachzuweisen, was für eine sehr geringe Expression dieses Proteins in reifen Ameloblasten spricht. Während Ameloblasten nach der Ausdifferenzierung und dem Abschluss der Schmelzproduktion ihren Stoffwechsel einstellen und beim Zahndurchbruch verloren gehen, bleiben Odontoblasten ihr Leben lang erhalten und produzieren ständig Dentin. Deshalb müssen vermutlich gerade Odontoblasten gut gegen Sauerstoffradikale geschützt werden. Hier könnte die peroxisomale Katalase eine wichtige Rolle spielen. In weiteren Studien wurde beschrieben, dass bei erhöhten Mengen  $H_2O_2$  die Odontoblastendifferenzierung und -proliferation angekurbelt wird und die Hemoxygenase1(HO-1)-Produktion und das Dentinsialophosphoprotein (DSPP) ansteigt (Lee et al 2006; Min et al 2008). Da die Ameloblasten weniger Katalase enthalten, ist anzunehmen, dass sie durch reaktive Sauerstoffspezies vermehrt geschädigt werden können. Möglicherweise wird dadurch auch der Ameloblastenstoffwechsel nach erfolgter Schmelzsekretion eingestellt. Welche Rolle ROS tatsächlich in der Schädigung der Ameloblasten, Ausdifferenzierung der Odontoblasten oder der anderen Mechanismen der Zahnentwicklung spielen, muss in zukünftigen Studien noch geklärt werden.

#### **5.5.2. Mögliche Funktion der Peroxisomen in der Synthese von Plasmalogenen, Cholesterin und polyungesättigten Fettsäuren (PUFA) in Zahngeweben**

In Peroxisomen sind bisher mehr als 130 Enzyme beschrieben worden und davon spielen etwa die Hälfte im Fettstoffwechsel eine große Rolle (Islinger et al 2006). In diesen Organellen wurden sowohl anabole Lipidstoffwechselwege zur Synthese von Plasmalogenen als auch katabole Wege zur  $\alpha$ - und  $\beta$ -Oxidation einer großen Vielfalt von Lipidderivaten beschrieben (Mannaerts und van Veldhoven 1996).

Plasmalogene sitzen in allen Zellmembranen als sogenannte ROS-Fänger und schützen somit vor den toxischen Wirkungen dieser aggressiven Moleküle. Die ersten drei Schritte der Plasmalogensynthese zur Herstellung der reaktiven Vinyetherbindung, finden intrazellulär ausschließlich in Peroxisomen statt. Plasmalogene sind besonders angereichert im Herzen und im Gehirn und machen ca. 18% der Phospholipide in diesen Geweben des Menschen aus. Bei den Patienten mit dem Zellweger-Syndrom ist die Peroxisomenbiogenese defekt, so dass die Plasmalogensynthese nicht stattfinden kann und diese Lipidklasse im Blut und Organen bei diesen Patienten drastisch erniedrigt ist. Da die Konzentration der Plasmalogene besonders im

Gehirn und im Herzen hoch ist, sind Schädigungen der Plasmamembranen auch in diesen Organsystemen bei Zellweger-Patienten am stärksten zu erwarten. Tatsächlich kommt es in Patienten mit peroxisomalen Krankheiten zur Schädigung der Myelinscheiden und zur Demyelinisierung. Neben den Plasmalogenen können vermutlich bis zu 45% der regulären Glycerolipide (mit Esterbindungen) über den peroxisomalen Dihydroxyacetonphosphat (DHAP)- Syntheseweg hergestellt werden (Hajra et al 2000). Phospholipide sind laut Studien im Zahnschmelz und im Dentin gefunden worden. Sie spielen dort eine wichtige Rolle bei der Mineralisation (Goldberg und Septier 2002). Schmelz- und Dentinphospholipide unterscheiden sich leicht in ihrer Zusammensetzung. Der Anteil der Phosphatidylcholin ist in beiden Hartsubstanzen etwa gleich.

Weiterhin finden die ersten Schritte der Bildung des Cholesterins bis zum Farnesylpyrophosphat in den Peroxisomen statt (Kovacs et al 2002). Cholesterin ist ebenfalls ein Bestandteil der Zellmembranen und als Vorstufe notwendig zur Synthese der Hauptkomponente der Steroidhormone und der Gallensäuren (Hayashi und Ohashi 1995). Die Fortsätze der Amelo- und Odontoblasten bestehen aus einer langen „Ausstülpung“ der Zellmembran. Interessanterweise waren auch im fortsatznahen Cytoplasma die meisten Peroxisomen lokalisiert, die einen hohen Gehalt an  $\beta$ -Oxidationsenzymen enthielten. Eventuell findet dort vermehrt peroxisomale  $\beta$ -Oxidation statt, die zur Herstellung von Acetyl-CoA-Einheiten führt, die in die Cholesterin und Plasmalogensynthese eingeschleust werden können (Karnati und Baumgart-Vogt 2009; Kovacs et al 2002).

In Studien von Goldberg und Septier (2002) wurden tatsächlich höhere Mengen an Cholesterin an den Odontoblastenfortsätzen nachgewiesen. Sie beschrieben, dass vom Zellkörper an bis in die Fortsätze der Cholesterinanteil zunimmt, sodass dieses dem Zellfortsatz eine Art Schutzbarriere bietet. Ebenso sichert sich so der Tomessche Fortsatz der Ameloblasten vor dem, um ihn herum wachsenden, Schmelz. In anderen Zellen wurde ähnliches beschrieben, weil auch in diesen Cholesterin der Zellmembran eine besondere Stabilität verleiht (Van Dijk et al 1976). Goldberg und Septier (2002) sprechen von zwei unterschiedlichen Verteilungsmustern des Cholesterins in der Plasmamembran: 1) Cholesterin, das membranassoziiert in Lipidrafts vorkommt und die auch reich an ungesättigten Fettsäuren und Plasmalogenen sind. Diese Lipidrafts haben wichtige Funktionen in der Endozytose und Signalgebung von der Plasmamembran. 2) Freies Cholesterin welches in der Zellmembran die Lipiddoppelschichten der Odontoblasten- und Ameloblastenfortsätze stabilisiert und schützt. Weiterhin lässt ein Fehlen von essentiellen Fettsäuren (PUFA) die Membranen für Wasser permeabler werden und führt zu einer

Epithelhyperplasie. PUFA sind Vorläufer von Prostaglandinen und Leukotrienen und hemmen die Synthese von Entzündungsmediatoren (Zytokine) durch die ROS-bindende Wirkung ihrer Doppelbindungen (Goldberg und Septier 2002). Somit schützen sie die Plasmamembran oder auch den Surfactantfilm in der Lunge vor toxischen Schädigungen (Sosenko 1995; Zoeller et al 1999).

Interessanterweise sind peroxisomale  $\beta$ -Oxidationsenzyme auch für die Modifikation und Synthese von mehrfach ungesättigten Fettsäuren (PUFA) zuständig (Hiltunen et al 1996) welche u.a. auch in Plasmamembranen Sauerstoffradikale binden können, z.B. im Surfactant der Lunge und dort eine wichtige Schutzfunktion einnehmen (Sosenko 1995; Zoeller et al 1999). In den Odonto- und Ameloblasten spielen die PUFA auch eine wichtige Rolle in der Signalübermittlung von der Plasmamembran bei Endozytosevorgängen (Goldberg und Septier 2002).

### **5.5.3. Kataboler peroxisomaler Lipidstoffwechsel – Regulation der Lipidhomöostase in Zahngewebe durch peroxisomale $\beta$ -Oxidation**

Der Abbau von Fettsäuren findet in Säugetierzellen in den Mitochondrien und in den Peroxisomen statt. Für diese Dissertation war im Wesentlichen die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation von Interesse. Bevor eine Fettsäure abgebaut werden kann, muss sie durch CoA aktiviert werden. Peroxisomale Membranen enthalten hierzu zwei unterschiedliche Acyl-CoA-Synthetasen für die Aktivierung langkettiger und sehr langkettiger Fettsäuren. Diese Acyl-CoA-Derivate werden über ABC-Transporter (ABCD1-4) durch die Peroxisomenmembran in die peroxisomale Matrix zur  $\beta$ -Oxidation eingeschleust (s.u.) (Wanders und Waterham 2006). In der peroxisomalen Matrix kommen zwei verschiedene  $\beta$ -Oxidationsketten vor, in denen jeweils vier hintereinanderfolgende Enzymreaktionen stattfinden. Der erste Oxidationsschritt ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der  $\beta$ -Oxidationsketten, der beim Menschen durch 2 verschiedene Acyl-CoA-Oxidasen katalysiert wird und bei dem  $H_2O_2$  entsteht. Dies sind: 1) die Palmitoyl-CoA-Oxidase (ACOXI) und die 2) verzweigtkettige (branched-chain) Acyl-CoA-Oxidase (ACOXII). Eicosanoide wie Prostaglandine und Leukotriene werden durch den 1.  $\beta$ -Oxidationsweg abgebaut und anschließend in verkürzter Form über die Niere ausgeschieden. Da der 1. $\beta$ -Oxidationsweg am Abbau von Eicosanoiden entscheidend beteiligt ist und Eicosanoide bei Entzündungsreaktionen im Zahngewebe (Pulpa, Parodontium) eine Rolle spielen, wurde ein Antikörper gegen ACOXI verwendet, um das Vorkommen dieses Stoffwechselweges in Zahngewebe zu untersuchen. Weiterhin wurde der peroxisomale

Lipidtransporter ABCD3 nachgewiesen, der die Lipidsubstrate über die peroxisomale Membran in die  $\beta$ -Oxidationskette einschleust (s.o.).

Alle Substrate der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation, auch die Eicosanoide = Prostaglandine + Leukotriene, können als Liganden für nukleäre Rezeptoren wirken (u.a. Peroxisomenproliferator-aktivierte Rezeptoren=PPARs) und führen über die Aktivierung von PPARs zu einer Peroxisomenproliferation und der Induktion der Gene peroxisomaler  $\beta$ -Oxidationsenzyme. Prostaglandine und Leukotriene entstehen sekundär nach der Freisetzung von Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Zellmembran durch die Wirkung von Cyclooxygenasen COX1/COX2 oder durch verschiedene Lipoxigenasen.

Bei Entzündungsvorgängen werden diese Lipidmediatoren vermehrt freigesetzt und können somit PPARs induzieren, die wiederum über PPREs (PPAR-responsive Elemente) in der Promoterregion eine Veränderung und Induktion der Aktivität abhängiger Gene (z.B. der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation) auslösen. Hiermit kann durch die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation die Homöostase der Liganden nukleärer Rezeptoren im Sinne eines „Feed-back Mechanismus“ aufrechterhalten werden (Karnati und Baumgart-Vogt 2008)

12, 15 Prostaglandin J2 stellt unter anderem einen Liganden für PPARgamma dar. In neueren Arbeiten wird weiterhin diskutiert, dass die Aktivierung besonders von PPARgamma auch zu der vermehrten Transkription antioxidativer Enzyme beiträgt, wodurch peroxisomaler Lipidstoffwechsel und ROS-Stoffwechsel eng miteinander gekoppelt werden (Karnati und Baumgart-Vogt 2008). Unter anderem stellen sie Liganden für PPARgamma dar (12,15-ProstaglandinJ2). PPARs sorgen allgemein für die Homeostase im Lipidstoffwechsel z.B. durch Einwirkung auf die Lipoproteinsynthese und Differenzierung von Adipozyten und durch die Regulation der peroxisomalen und mitochondrialen  $\beta$ -Oxidation.

#### **5.5.4. Mögliche weitere Funktionen der Peroxisomen im $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt der Zahngewebe**

ATP-abhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen entlang der Plasmamembran von Amelo- und Odontoblasten spielen gemeinsam mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern des L-Typs in der Mineralisierung der Zahnhartsubstanzen eine große Rolle (Linde und Lundgren 1995; Sasaki und Garant 1986; Sasaki et al 1997).  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase-Aktivität wurde bisher hauptsächlich an der Plasmamembran gefunden (Sasaki und Garant 1986), es sind aber auch unter unterschiedliche Inkubationsbedingungen in intrazellulären Organellenmembranen beschrieben worden (Linde und Lundgren 1995; Sasaki und Garant 1986).

Neuere Studien zeigen, dass auch Peroxisomen zur Calciumspeicherung und -freisetzung in der Lage sind. In diesem Zusammenhang wurde eine  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase in der

Peroxisomenmembran lokalisiert (Drago et al 2008; Raychaudhury et al 2006). Der genaue Mechanismus des peroxisomalen Calciumtransportes ist aber noch nicht geklärt. Laut dieser Studien sollen aber die Peroxisomen eine wichtige Rolle im Calcium-Haushalt einnehmen.

Unsere Färbungen haben gezeigt, dass gerade sehr viele Peroxisomen in der Sekretionsphase differenzierter Amelo- und Odontoblasten in fortsatznahen Arealen vorkommen. Gerade in dieser Phase haben die Amelo- und Odontoblasten einen hohen Bedarf an Calcium, weil es ein wesentlicher Bestandteil zur Mineralisierung der Schmelz- und Dentinmatrix darstellt. Zukünftige Studien müssen klären, inwieweit Peroxisomen in den Fortsätzen der Amelo- und Odontoblasten tatsächlich in deren  $\text{Ca}^{2+}$ -Haushalt eingeschaltet sind.

### **5.6. Vergleich von Peroxisomen und Mitochondrien in Zahngeweben**

Mitochondrien weisen im Vergleich zu anderen Zellorganellen die meisten zellbiologischen Gemeinsamkeiten zu Peroxisomen auf. Sie entstehen ebenso durch Teilung und Proliferation und ihre meisten Proteine werden an freien Ribosomen des Cytoplasmas synthetisiert und posttranslational in die Mitochondrienmembran oder -matrix importiert (Delille et al 2009). Weiterhin besitzen die Mitochondrien auch  $\beta$ -Oxidationsenzyme, mit denen sie jedoch ein engeres Substratspektrum, besonders langkettige Fettsäuren abbauen, und die daraus entstandenen Reduktionsäquivalente zur späteren ATP-Gewinnung in die Atmungskette einschleusen (Mannaerts und van Veldhoven 1996). Mitochondrien sind dadurch die „Kraftwerke“ der eukaryotischen Zellen. Sie dienen zur ATP-Produktion. Deshalb finden sich besonders viele Mitochondrien in Zellen, die sehr viel Energie brauchen, wie z.B. Muskelzellen (Bennighoff und Drenckhahn 2008).

Da Peroxisomen Fettsäuren nur bis C8-Kettenlänge oxidieren und die Zwischenprodukte in Mitochondrien einschleusen, sind beide Organellen metabolisch aneinander gekoppelt (Mannaerts und van Veldhoven 1996). D.h. die peroxisomale  $\beta$ -Oxidation trägt somit zur Energiegewinnung der Zelle bei, obwohl Peroxisomen selbst keine Energie gewinnen können, weil ihnen das Elektronentransportsystem dazu fehlt (Alberts et al 2002; Kleinig und Sitte 1992). Bei Überladung der Mitochondrien mit Lipiden werden diese im Sinne eines Überlaufventils in die Peroxisomen zum Abbau eingeschleust, z.B. bei der Behandlung mit hypolipidämischen Pharmaka. Dabei werden auch die PPARs aktiviert und Peroxisomen proliferieren stark zur Wiederherstellung der Lipidhomeostase (Fahimi 1969). Weiterhin wurde bei peroxisomalen Krankheiten eine Mitochondrienproliferation beschrieben und starke pathologische Mitochondrienalterationen mit Veränderungen verschiedener Atmungskettenkomplexe nachgewiesen (Baumgart et al 2001).

Nach Darstellung der Mitochondrien und der Peroxisomen mittels anti-KomplexIII der Atmungskette und anti-Pex14p-Antikörpern, fiel auf, dass beide Organellen unterschiedliche intrazelluläre Lokalisationen im Zahngewebe aufwiesen. Während die meisten Peroxisomen, wie vorher bereits beschrieben, in den Hartsubstanz-benachbarten Fortsätzen der Amelo- und Odontoblasten zu finden waren, waren die Mitochondrien vermehrt im darunterliegenden restlichen Cytoplasma lokalisiert. In anderen Geweben des Kopfbereiches, wie z.B. Mundhöhlenepithel oder Nackenmuskulatur waren dagegen Peroxisomen und Mitochondrien gleichmäßig verteilt. Im Vergleich zur Muskulatur mit hoher Mitochondrienzahl und relativ weniger Peroxisomen enthielten die Zahngewebe oder das Mundhöhlenepithel in Relation eine wesentlich höhere Anzahl von Peroxisomen. Während die Mitochondrien in Ameloblasten oder Odontoblasten die Energie für ATP-abhängige Transportprozesse liefern (z.B. Vesikeltransport) sind die apikal lokalisierten Peroxisomen vermutlich vermehrt in Lipidsyntheseprozesse und Schadstoffdetoxifikation zum Schutz der Fortsätze und Hartsubstanzen eingeschaltet.

#### **5.7. Erste Hinweise auf veränderte Zahngewebe in Knockout-Mäusen mit peroxisomalem Biogenesedefekt (PEX11 $\beta$ –/–)**

Bei Patienten mit milder Ausprägung von peroxisomalen Biogenesedefekten, z.B. mit Mutationen des PEX1-Gens, wurden Schmelzhypoplasien, Zahnfehlstellungen und ein verzögerter Zahndurchbruch beschrieben. Deshalb kann man davon ausgehen, dass ein Verlust der Peroxisomen oder die Dysregulation des peroxisomalen Stoffwechsels bereits während der Zahnentwicklung zu krankhaften Veränderungen der Zahngewebe führt. Aus diesem Grund wurden neugeborene (P0) PEX11 $\beta$ -KO-Mäuse auf Veränderungen untersucht.

Mittlerweile wurden drei verschiedene Pex11 Proteine (Pex11 $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -) in Mäusen beschrieben, deren Funktion in den Prozess der Peroxisomenproliferation eingeschaltet sind (Li et al 2002; Li und Gould 2002). Von diesem Pex11 Protein stellt Pex11 $\beta$ p, das konstitutionell-regulierte, in den meisten Geweben vorkommende Protein, zur Regulation der Peroxisomenanzahl dar. PEX11 $\beta$ -KO-Tiere stellen überraschenderweise trotz vorhandener Peroxisomen, wenn auch in geringer Anzahl, ein gutes Modell zur Untersuchung der molekularen Pathogenese der Organdefekte bei peroxisomalen Erkrankungen dar (Li und Gould 2002). Da PEX11 $\beta$  –/– Mäuse bereits am ersten Tag nach der Geburt versterben, mussten die Untersuchungen am Zahngewebe an neugeborenen Mäusen (P0) durchgeführt werden. Die Ergebnisse erbrachten eine eindeutige Retardierung der Zahnentwicklung im Vergleich zu Kontrollmäusen des gleichen Alters. Weiterhin traten im Ameloblastenverband

große Lücken auf, die in kontrollierten unterschiedlicher Entwicklungsstadien nie vorhanden waren. Man könnte deshalb eine Veränderung der Ameloblasten vermuten, wodurch später, die in der Studie beschriebenen Schmelzhypoplasien und Zahnfehlstellungen auftreten könnten (Poll-The et al 2004). Deutlich konnte man Peroxisomencluster und elongierte tubuläre Peroxisomen erkennen, die auch schon bei Li et al (2002) in Leberzellen bei den KO-Tieren beschrieben wurden. Ähnlich wie im Zahngewebe scheinen auch in der Niere und der Leber eine Wachstums- und Differenzierungsverzögerung bei den PEX11 $\beta$ KO-Tieren vorhanden zu sein (Li et al 2002) was unter Umständen durch veränderte Reaktion auf Wachstumsfaktoren bedingt sein könnte. Sowohl die Zahndifferenzierung als auch der Zahndurchbruch wird bekanntermaßen durch verschiedene Wachstumsfaktoren gesteuert (z.B. EGF, TGFs) und veränderte Signaltransduktion in Wachstumsfaktorkaskaden führt zu verlangsamten oder abnormalem Zahndurchbruch (Wise et al 2002). TGF- $\beta$  spielt weiterhin in der Differenzierung der Odontoblasten eine bedeutende Rolle (Inage und Toda 1996) und wird während der Reizdentinbildung vorgefunden (Hwang et al 2008). Weiterhin scheinen auch IGFs in der Zahnentwicklung eine große Rolle zu spielen (Caton et al 2005; Joseph et al 1993; Schroll 2004; Yamamoto et al 2006). IGFs werden in vielen Geweben exprimiert, um die Gewebedifferenzierung und- proliferation anzuregen sowie Apoptose einzuleiten. IGFs sind Mediatoren des Somatotropin (Wachstumshormon = growth hormone = GH) welches die Stützgewebe zum Wachstum anregt (Knochen, Schmelz, Dentin, Zahnzement) (Li et al 2009). IGFs spielen eine wichtige Rolle für das Ausformen der Mandibula und das Wachstum der Zähne. Einen besonderen Einfluss nehmen sie auf die Ameloblastendifferenzierung und deren Schmelzsekretion (Caton et al 2005; Joseph et al 1993). IGF1 ist ein starker Stimulator der Zellproliferation. In dieser Hinsicht hat IGF1 sogar einen größeren Wachstumseffekt als Somatotropin (Young 1995). In einer neueren Studie konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass in Zahnorgankulturen die Amelogenin und Enamelinexpression durch IGF1-Zugabe stark anstieg (Caton et al 2005). Deshalb ist davon auszugehen, dass vermehrte IGF1-Signaltransduktion eine erhöhte Schmelzsekretion nach sich zieht. IGF1 scheint im Vergleich hierzu weniger auf Odontoblasten zu wirken (Caton et al 2005). Tatsächlich scheinen Ameloblasten in einer Art autokrinen Regulation in unterschiedlichen Stadien der Zahnentwicklung selbst IGF1 und dessen Rezeptor zu synthetisieren. In Präameloblasten war durch in situ Hybridisierung noch keine IGF1-Synthese nachzuweisen, während besonders sekretorische Ameloblasten im Gegensatz hierzu viel IGF-mRNAexprimierten (Joseph et al 1993). Auch IGF1Rezeptoren werden hauptsächlich im äußeren und inneren Schmelzepithel



exprimiert (Joseph et al 1993). Im späten Glockenstadium ist dieser Rezeptor kaum noch nachweisbar (Bellone et al 1990).

Interessanterweise wurden Veränderungen in der IGF1 Signaltransduktion bei Knockoutmäusen mit peroxisomaler Defizienz und Zellweger-Syndrom-Phänotyp (PEX5<sup>-/-</sup>) beschrieben (Baes et al 1997). Weiterhin wurde von Baes und Kollegen beschrieben, dass auch Fibroblastenkulturen der PEX5<sup>-/-</sup> Mäuse mit einer geringen Proliferationsrate auf die Zugabe von Wachstumsfaktor-Cocktails reagierten. Somit könnten sowohl die Retardierung der Zahnentwicklung in den PEX11β<sup>-/-</sup>-Mäusen, als auch die Lückendefekte zu Unregelmäßigkeiten in der Ameloblastenreihe, auf Störungen in Wachstumsfaktorkaskaden zurückgeführt werden. Interessanterweise wurden Veränderungen in der IGF-Wachstumsfaktorkaskade in PEX5<sup>-/-</sup>-Mäusen mit Zellweger-Syndrom beschrieben. Wachstumsfaktoren (wie z.B. NGF, EGF) bewirken weiterhin auch strukturelle Veränderungen der Peroxisomen. Unter ihrem Einfluss bilden diese Organellen vermehrt tubuläre Strukturen aus (Schrader et al 1999). In dieser Dissertation wurden auch bei PEX11β<sup>-/-</sup>-Mäusen im Zahngewebe vermehrt tubuläre Peroxisomen gefunden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass Biogenesestörungen der Peroxisomen (hier am Beispiel der Maus PEX11β<sup>-/-</sup> gezeigt) auch zu pathologischen Veränderungen in den Zahngeweben von Mäusen führen, durch die die Zahndefekte (z.B. verspäteter Zahndurchbruch, Zahnfehlstellungen und Schmelzhypoplasie) bei den entsprechenden Patienten erklärt werden könnten.

### **Ausblick:**

In der vorliegenden Dissertation wurden grundsätzliche Arbeiten zur Charakterisierung des peroxisomalen Kompartiments in verschiedenen Zelltypen der Zahngewebe durchgeführt und signifikante Veränderungen in diesem Kompartiment und den Entwicklungsstadien der Amelo- und Odontoblasten in Knockoutmäusen mit peroxisomalen Biogenesedefekt beschrieben. Jedoch müssen in zukünftigen Studien die molekularen Mechanismen, die zu Entwicklungsfehlbildungen der Zähne bei peroxisomalen Krankheiten führen, aufgeklärt werden. Die PEX11β-Mäuse stellten diesbezüglich ein sehr gutes experimentelles Modellsystem dar, an dem durch selektive Mikrodissektion von Amelo- und Odontoblasten über vergleichende Microarray-Analysen, Veränderungen des Expressionsmusters spezifischer mRNAs von Proteinen verschiedener Signaltransduktions- oder Stoffwechselwege festgestellt werden könnten. Nach Aufklärung der entsprechenden intrazellulären Veränderungen, könnten eventuell auch neue Therapiemöglichkeiten zur

Behandlung oder Vorbeugung von Organveränderungen (z.B. auch von Zahnmissbildungen) bei Patienten mit peroxisomalen Krankheiten aufgezeigt werden.

## 6. Zusammenfassung

Milde Formen peroxisomaler Krankheiten gehen mit Mikrognathie, Zahnfehlstellungen und Schmelzhypoplasien einher. Trotz dieser bekannten Zahndefekte wurden diese Zellorganellen und deren metabolische Funktion in Zahngeweben jedoch noch nicht untersucht. Peroxisomen im Zahngewebe wurden lediglich in der Literatur in einer ultrastrukturellen Studie in Odontoblasten kurz erwähnt, jedoch nicht näher charakterisiert.

Mein Ziel war es daher herauszufinden, inwieweit diese Organellen in Zahngeweben vorkommen und welche Aufgaben sie dort erfüllen könnten. Zur Beschreibung peroxisomaler Veränderungen während der Zahnentwicklung wurden Mäuse verschiedener Entwicklungsstadien (E13,5-P3 und P90) mit Formaldehyd-Fixans perfusionsfixiert und zur morphologischen Auswertung in Paraffin eingebettet. Weiterhin wurden Kopfpräparate von Knockoutmäusen mit einem peroxisomalen Biogenesedefekt (PEX11 $\beta$ , P0.5) auf Veränderung der Zahnentwicklung untersucht. Außerdem wurden in verschiedenen Zahngeweben spezifische mRNAs peroxisomaler Proteine und zelltypspezifischer Antigene mittels RT-PCR an mikrodisektierten Material von Amelo- und Odontoblasten nachgewiesen. Nach Etablierung von optimalen methodischen Voraussetzungen zur subzellulären Lokalisation von Organellen in Paraffinschnitten von Zahngewebe, konnten mithilfe von monospezifischen Antikörpern gegen verschiedene peroxisomale Markerproteine (Katalase, Acyl-CoA-Oxidase I, ABCD3—Lipid-Transporter, Biogeneseproteine: Pex13p und Pex14p) Peroxisomen in verschiedenen Zahngeweben durch indirekte Immunhistochemie mit ABC-Verfahren oder Immunfluoreszenz lokalisiert und deren heterogene Enzymzusammensetzung in spezifischen Zellen der Zahngewebe nachgewiesen werden. Weiterhin wurde das Vorkommen der entsprechenden mRNAs in Amelo- und Odontoblasten gezeigt. Die Ergebnisse erbrachten eindeutig, dass Peroxisomen in allen Zahngeweben in unterschiedlicher Anzahl und verschiedener Lokalisation vorkommen. Jedoch besonders in sekretorischen Amelo- und Odontoblasten ist dieses Zellkompartiment stark ausgeprägt. Im Gegensatz zu Mitochondrien sind in diesen Zellen die Peroxisomen besonders häufig in den jeweils fortsatznahen Arealen lokalisiert, was gemeinsam mit dem Vorhandensein deren metabolischer Enzyme auf eine spezifische Funktion dieser Organellen während der Sekretionsphase schließen lässt. Im Gegensatz zu Odontoblasten beinhalten Peroxisomen in Ameloblasten kaum Katalase-Protein, was zu einer stärkeren Empfindlichkeit der Ameloblasten gegenüber von reaktiven Sauerstoffspezies (z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) führen könnte. In PEX11 $\beta$ -Knockout-Mäusen wurden eindeutige Entwicklungsveränderungen in der

Ausprägung der Amelo- und Odontoblastenanordnung und deren Maturierung nachgewiesen. Das PEX11 $\beta$ -Knockout-Maus-Modell scheint sich deshalb gut für zukünftige Studien zur Untersuchung der molekularen Pathogenese der Zahnmissbildungen bei peroxisomalen Krankheiten zu eignen.

## 7. Summary

Patients with mild forms of peroxisomal disorders show facial dysmorphism, suffer from deformations in dentition and exhibit enamel hypoplasia. However, no information is available on peroxisomes in dental and paradental tissues. In the peer reviewed literature in one ultrastructural study peroxisomes were mentioned in odontoblasts however, without any closer characterization. To get some more insights on the functional role of peroxisomes in dental tissues, in this dissertation the distribution and enzyme composition of these organelles were described in different stages of tooth development (E13.5-P3) and knockout-mice with a peroxisomal biogenesis defect (PEX11 $\beta$ , P0.5) in formaldehyde-fixed and paraffin embedded tissue samples. In addition, fresh unfixed heads were immediately frozen to be used for laser-assisted microdissection of ameloblasts and odontoblasts followed by RNA isolation and RT-PCR analysis for the expression of marker genes for peroxisomes and dental specific cell types.

After establishment of the correct methodological conditions for subcellular organelle visualization by adaption of the immunohistochemical ABC-peroxidase method and the indirect immunofluorescence technique to dental tissues, peroxisomes and their enzyme composition were analyzed in different cell types and tooth regions using monospecific antibodies for different marker proteins such as catalase, acyl-CoA-oxidase I, ABCD3-lipid-transporter, Pex13p and Pex14p. Furthermore we detected the corresponding mRNAs of the peroxisomal genes in ameloblasts and odontoblasts.

The results of this thesis revealed the presence of peroxisomes in all dental tissues with different intracellular distribution and abundance between distinct cell types. A significant increase of the abundance and a redistribution of peroxisomes were noted during the course of maturation of ameloblasts and odontoblasts. In contrast to mitochondria, peroxisomes in differentiated ameloblasts were localized mainly in the vicinity of the Tomes process. During this maturation process a strong heterogeneity of peroxisomal enzyme content appeared within distinct cell types. A drastic down regulation of catalase in maturing ameloblasts was noted in comparison to odontoblasts. The importance of functional peroxisomal organelles for tooth development and maturation of ameloblasts and odontoblasts was demonstrated in PEX11 $\beta$ -knockout-mice in which the dental tissues were clearly different to the wildtyp. The structural defects of ameloblast rows in teeth of PEX11 $\beta$ <sup>-/-</sup> mice suggest that this animal model is suitable to study the development of the tooth deformities occurring in patients with peroxisomal disorders.

## 8. Literatur

- Ahlemeyer B, Neubert I, Kovacs WJ, Baumgart-Vogt E. 2007. Differential expression of peroxisomal matrix and membrane proteins during postnatal development of mouse brain. *J Comp Neurol* 505(1):1-17.
- Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular biology of the cell*. Science G, editor. New York.
- Arana-Chavez VE, Massa LF. 2004. Odontoblasts: the cells forming and maintaining dentine. *Int J Biochem Cell Biol* 36(8):1367-73.
- Badea L, Herlea V, Dima SO, Dumitrascu T, Popescu I. 2008. Combined gene expression analysis of whole-tissue and microdissected pancreatic ductal adenocarcinoma identifies genes specifically overexpressed in tumor epithelia. *Hepatogastroenterology* 55(88):2016-27.
- Baes M, Gressens P, Baumgart E, Carmeliet P, Casteels M, Franssen M, Evrard P, Fahimi D, Declercq PE, Collen D and others. 1997. A mouse model for Zellweger syndrome. *Nat Genet* 17(1):49-57.
- Baumgart E. 1997. Application of in situ hybridization, cytochemical and immunocytochemical techniques for the investigation of peroxisomes. A review including novel data. Robert Feulgen Prize Lecture 1997. *Histochem Cell Biol* 108(3):185-210.
- Baumgart E, Fahimi HD, Steininger H, Grabenbauer M. 2003. A review of morphological techniques for detection of peroxisomal (and mitochondrial) proteins and their corresponding mRNAs during ontogenesis in mice: application to the PEX5-knockout mouse with Zellweger syndrome. *Microsc Res Tech* 61(2):121-38.
- Baumgart E, Vanhorebeek I, Grabenbauer M, Borgers M, Declercq PE, Fahimi HD, Baes M. 2001. Mitochondrial alterations caused by defective peroxisomal biogenesis in a mouse model for Zellweger syndrome (PEX5 knockout mouse). *Am J Pathol* 159(4):1477-94.
- Bellone C, Barni T, Pagni L, Balboni GC, Vannelli GB. 1990. [Growth factors in human tooth development]. *Boll Soc Ital Biol Sper* 66(3):231-8.
- Bennighoff A, Drenkhahn D. 2008. *Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*. Band 1. Elsevier, editor. München.
- Boenisch T. 2006. Heat-induced antigen retrieval: what are we retrieving? *J Histochem Cytochem* 54(9):961-4.
- Boveris A, Oshino N, Chance B. 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128(3):617-30.
- Brites P, Waterham HR, Wanders RJ. 2004. Functions and biosynthesis of plasmalogens in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1636(2-3):219-31.
- Carda C, Peydro A. 2006. Ultrastructural patterns of human dentinal tubules, odontoblasts processes and nerve fibres. *Tissue Cell* 38(2):141-50.
- Caton J, Bringas P, Jr., Zeichner-David M. 2005. IGFs increase enamel formation by inducing expression of enamel mineralizing specific genes. *Arch Oral Biol* 50(2):123-9.

- Chang CC, South S, Warren D, Jones J, Moser AB, Moser HW, Gould SJ. 1999. Metabolic control of peroxisome abundance. *J Cell Sci* 112 ( Pt 10)(Pt 10):1579-90.
- Couve E. 1986. Ultrastructural changes during the life cycle of human odontoblasts. *Arch Oral Biol.* 31(10):643-51.
- De Duve C. 1965. The separation and characterization of subcellular particles. *Harvey Lect* 59:49-87.
- De Duve C, Baudhuin P. 1966. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiol Rev* 46(2):323-57.
- Delille HK, Alves R, Schrader M. 2009. Biogenesis of peroxisomes and mitochondria: linked by division. *Histochem Cell Biol.* 131(4):441-6. Epub 2009 Feb 14.
- Deutsch D, Pe'er E. 1982. Development of enamel in human fetal teeth. *J Dent Res. Spec(No)*:1543-51.
- Dinges HP, Breitenacker G, Breitfellner G, Denk H, Kerjaschki D, Mikuz M, Ratschek M. ÖGP - Qualitätsstandards in der Pathologie; 2000. ÖSTERREICHISCHE GESELLSCHAFT FÜR PATHOLOGIE.
- Distel B, Erdmann R, Gould SJ, Blobel G, Crane DI, Cregg JM, Dodt G, Fujiki Y, Goodman JM, Just WW and others. 1996. A unified nomenclature for peroxisome biogenesis factors. *J Cell Biol.* 135(1):1-3.
- Domingues MG, Jaeger MM, Araujo VC, Araujo NS. 2000. Expression of cytokeratins in human enamel organ. *Eur J Oral Sci.* 108(1):43-7.
- Drago I, Giacomello M, Pizzo P, Pozzan T. 2008. Calcium dynamics in the peroxisomal lumen of living cells. *J Biol Chem.* 283(21):14384-90. Epub 2008 Mar 24.
- Fahimi HD. 1969. Cytochemical localization of peroxidatic activity of catalase in rat hepatic microbodies (peroxisomes). *J Cell Biol.* 43(2):275-88.
- Fahimi HD. 1974. Effect of buffer storage on fine structure and catalase cytochemistry of peroxisomes. *J Cell Biol.* 63(2 Pt 1):675-83.
- Fahimi HD, Baumgart E. 1999. Current cytochemical techniques for the investigation of peroxisomes. A review. *J Histochem Cytochem.* 47(10):1219-32.
- Fan CY, Pan J, Chu R, Lee D, Kluckman KD, Usuda N, Singh I, Yeldandi AV, Rao MS, Maeda N and others. 1996. Hepatocellular and hepatic peroxisomal alterations in mice with a disrupted peroxisomal fatty acyl-coenzyme A oxidase gene. *J Biol Chem* 271(40):24698-710.
- Faust PL, Hatten ME. 1997. Targeted deletion of the PEX2 peroxisome assembly gene in mice provides a model for Zellweger syndrome, a human neuronal migration disorder. *J Cell Biol* 139(5):1293-305.
- Fincham AG, Belcourt AB, Termine JD. 1983. Molecular composition of the protein matrix of developing human dental enamel. *J Dent Res.* 62(1):11-5.
- Fleischmannova J. 2008. Mouse models of abnormalities. *Eur J Oral Sci.* 116(1):1-10.



- Gansler H, Rouiller C. 1956. [Physiological and pathological changes of mitochondria; electron-microscopic study.]. Schweiz Z Pathol Bakteriol. 19(2):217-43.
- Gärtner J. 2000. Organelle disease: peroxisomal disorders. Eur J Pediatr. 159(Suppl 3):S236-9.
- Gaspersic D. 1995. Micromorphometric analysis of cervical enamel structure of human upper third molars. Arch Oral Biol. 40(5):453-7.
- Goldberg M, Septier D. 2002. Phospholipids in amelogenesis and dentinogenesis. Crit Rev Oral Biol Med. 13(3):276-90.
- Grabenbauer M. 2001. Das peroxisomale Kompartiment während der Fötalentwicklung der normalen und der transgen Pex5-defizienten Maus. . Heidelberg.
- Grabenbauer M, Fahimi HD, Baumgart E. 2001. Detection of peroxisomal proteins and their mRNAs in serial sections of fetal and newborn mouse organs. J Histochem Cytochem. 49(2):155-64.
- Hajra AK, Larkins LK, Das AK, Hemati N, Erickson RL, MacDougald OA. 2000. Induction of the peroxisomal glycerolipid-synthesizing enzymes during differentiation of 3T3-L1 adipocytes. Role in triacylglycerol synthesis. J Biol Chem. 275(13):9441-6.
- Hall BD, Spiegelman S. 1961. Sequence complementarity of T2-DNA and T2-specific RNA. Proc Natl Acad Sci U S A. 47:137-63.
- Hartley BS. 1970. Strategy and tactics in protein chemistry. Biochem J 119(5):805-22.
- Hayashi H, Oohashi M. 1995. Incorporation of acetyl-CoA generated from peroxisomal beta-oxidation into ethanolamine plasmalogen of rat liver. Biochim Biophys Acta. 1254(3):319-25.
- Heiland I, Erdmann R. 2005. Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. Febs J. 272(10):2362-72.
- Hellwig E. 2003. Einführung in die Zahnerhaltung. München: Urban und Fischer Verlag.
- Hermann R. 1956. Das Verhalten der Nukleinsäuren im Laufe der Zahnentwicklung. Z mikroskop Anat 45: 254-265.
- Hiltunen JK, Filppula SA, Koivuranta KT, Siivari K, Qin YM, Hayrinen HM. 1996. Peroxisomal beta-oxidation and polyunsaturated fatty acids. Ann N Y Acad Sci. 804:116-28.
- Hoffmann M, Olson K, Cavender A, Pasqualini R, Gaikwad J, D'Souza RN. 2001. Gene expression in a pure population of odontoblasts isolated by laser-capture microdissection. J Dent Res. 80(11):1963-7.
- Hu JC, Sun X, Zhang C, Simmer JP. 2001. A comparison of enamelin and amelogenin expression in developing mouse molars. Eur J Oral Sci. 109(2):125-32.
- Hwang YC, Hwang IN, Oh WM, Park JC, Lee DS, Son HH. 2008. Influence of TGF-beta1 on the expression of BSP, DSP, TGF-beta1 receptor I and Smad proteins during reparative dentinogenesis. J Mol Histol. 39(2):153-60. Epub 2007 Oct 11.

- Immenschuh S, Baumgart-Vogt E, Tan M, Iwahara S, Ramadori G, Fahimi HD. 2003. Differential cellular and subcellular localization of heme-binding protein 23/peroxiredoxin I and heme oxygenase-1 in rat liver. *J Histochem Cytochem.* 51(12):1621-31.
- Inage T, Toda Y. 1996. Gene expression of TGF-beta 1 and elaboration of extracellular matrix using in situ hybridization and EM radioautography during dentinogenesis. *Anat Rec.* 245(2):250-66.
- Islinger M, Luers GH, Li KW, Loos M, Volkl A. 2007. Rat liver peroxisomes after fibrate treatment. A survey using quantitative mass spectrometry. *J Biol Chem* 282(32):23055-69.
- Islinger M, Luers GH, Zischka H, Ueffing M, Volkl A. 2006. Insights into the membrane proteome of rat liver peroxisomes: microsomal glutathione-S-transferase is shared by both subcellular compartments. *Proteomics.* 6(3):804-16.
- Janones DS, Massa LF, Arana-Chavez VE. 2005. Immunocytochemical examination of the presence of amelogenin during the root development of rat molars. *Arch Oral Biol.* 50(5):527-32. Epub 2004 Dec 15.
- Jernvall J, Kettunen P, Karavanova I, Martin LB, Thesleff I. 1994. Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *Int J Dev Biol.* 38(3):463-9.
- Joseph BK, Savage NW, Young WG, Gupta GS, Breier BH, Waters MJ. 1993. Expression and regulation of insulin-like growth factor-I in the rat incisor. *Growth Factors.* 8(4):267-75.
- Josephsen K, Smith CE, Nanci A. 1999. Selective but nonspecific immunolabeling of enamel protein-associated compartments by a monoclonal antibody against vimentin. *J Histochem Cytochem.* 47(10):1237-45.
- Kagayama M, Zhu JX, Sasano Y, Sato H, Mayanagi H. 1997. Development of interglobular dentine in rat molars and its relation to maturation of enamel. *Anat Embryol (Berl).* 196(6):477-83.
- Karnati S, Baumgart-Vogt E. 2008. Peroxisomes in mouse and human lung: their involvement in pulmonary lipid metabolism. *Histochem Cell Biol.* 130(4):719-40. Epub 2008 Jul 30.
- Karnati S, Baumgart-Vogt E. 2009. Peroxisomes in airway epithelia and future prospects of these organelles for pulmonary cell biology. *Histochem Cell Biol* 131(4):447-54.
- Katchburian E, Holt SJ. 1972. Studies on the development of ameloblasts. I. Fine structure. *J Cell Sci.* 11(2):415-47.
- Keith LM. 1996. *Grundlagen der Medizinischen Embryologie* Stuttgart: Enke Verlag.
- Keranen SV, Aberg T, Kettunen P, Thesleff I, Jernvall J. 1998. Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev Genes Evol.* 208(9):477-86.
- Kleinig H, Sitte P. 1992. *Zellbiologie*. Stuttgart, New York: Gustav Fischer Verlag.
- Knippers R. 2006. *Molekulare Genetik*. Stuttgart: Thieme Verlag.

- Kovacs WJ, Olivier LM, Krisans SK. 2002. Central role of peroxisomes in isoprenoid biosynthesis. *Prog Lipid Res.* 41(5):369-91.
- Kubota K, Lee DH, Tsuchiya M, Young CS, Everett ET, Martinez-Mier EA, Snead ML, Nguyen L, Urano F, Bartlett JD. 2005. Fluoride induces endoplasmic reticulum stress in ameloblasts responsible for dental enamel formation. *J Biol Chem.* 280(24):23194-202. Epub 2005 Apr 23.
- Lazarow PB. 1987. The role of peroxisomes in mammalian cellular metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 10(Suppl 1):11-22.
- Lazarow PB, Fujiki Y. 1985. Biogenesis of peroxisomes. *Annu Rev Cell Biol.* 1:489-530.
- Lee DH, Lim BS, Lee YK, Yang HC. 2006. Effects of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on alkaline phosphatase activity and matrix mineralization of odontoblast and osteoblast cell lines. *Cell Biol Toxicol.* 22(1):39-46.
- Li C, Risnes S. 2004. SEM observations of Retzius lines and prism cross-striations in human dental enamel after different acid etching regimes. *Arch Oral Biol.* 49(1):45-52.
- Li G, Barrett EJ, Ko SH, Cao W, Liu Z. 2009. Insulin and insulin-like growth factor-I receptors differentially mediate insulin-stimulated adhesion molecule production by endothelial cells. *Endocrinology.* 150(8):3475-82. Epub 2009 May 7.
- Li X, Baumgart E, Morrell JC, Jimenez-Sanchez G, Valle D, Gould SJ. 2002. PEX11 beta deficiency is lethal and impairs neuronal migration but does not abrogate peroxisome function. *Mol Cell Biol.* 22(12):4358-65.
- Li X, Gould SJ. 2002. PEX11 promotes peroxisome division independently of peroxisome metabolism. *J Cell Biol.* 156(4):643-51. Epub 2002 Feb 11.
- Linde A, Goldberg M. 1993. Dentinogenesis. *Crit Rev Oral Biol Med.* 4(5):679-728.
- Linde A, Lundgren T. 1995. From serum to the mineral phase. The role of the odontoblast in calcium transport and mineral formation. *Int J Dev Biol.* 39(1):213-22.
- Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. 2006. *Biochemie und Pathobiochemie.* Berlin: Springer Verlag.
- Lombardi T, Samson J, Muhlhauser J, Fiore-Donno G, Maggiano N, Castellucci M. 1992. Expression of intermediate filaments and actins in human dental pulp and embryonic dental papilla. *Anat Rec.* 234(4):587-92.
- Lundgren T, Persson LG, Engstrom EU, Chabala J, Levi-Setti R, Noren JG. 1998. A secondary ion mass spectroscopic study of the elemental composition pattern in rat incisor dental enamel during different stages of ameloblast differentiation. *Arch Oral Biol.* 43(11):841-8.
- MacKenzie A, Ferguson MW, Sharpe PT. 1992. Expression patterns of the homeobox gene, Hox-8, in the mouse embryo suggest a role in specifying tooth initiation and shape. *Development.* 115(2):403-20.
- Mannaerts GP, van Veldhoven PP. 1996. Functions and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Ann N Y Acad Sci.* 804:99-115.

- Martens K, Ver Loren van Themaat E, van Batenburg MF, Heinaniemi M, Huyghe S, Van Hummelen P, Carlberg C, Van Veldhoven PP, Van Kampen A, Baes M. 2008. Coordinate induction of PPAR alpha and SREBP2 in multifunctional protein 2 deficient mice. *Biochim Biophys Acta* 1781(11-12):694-702.
- Marzioch M, Erdmann R, Veenhuis M, Kunau WH. 1994. PAS7 encodes a novel yeast member of the WD-40 protein family essential for import of 3-oxoacyl-CoA thiolase, a PTS2-containing protein, into peroxisomes. *Embo J.* 13(20):4908-18.
- Masters CJ. 1996. Cellular signalling: the role of the peroxisome. *Cell Signal.* 8(3):197-208.
- Maxwell M, Bjorkman J, Nguyen T, Sharp P, Finnie J, Paterson C, Tonks I, Paton BC, Kay GF, Crane DI. 2003. Pex13 inactivation in the mouse disrupts peroxisome biogenesis and leads to a Zellweger syndrome phenotype. *Mol Cell Biol* 23(16):5947-57.
- McCollum D, Monosov E, Subramani S. 1993. The pas8 mutant of *Pichia pastoris* exhibits the peroxisomal protein import deficiencies of Zellweger syndrome cells--the PAS8 protein binds to the COOH-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal, and is a member of the TPR protein family. *J Cell Biol.* 121(4):761-74.
- McLachlan JL, Smith AJ, Cooper PR. 2003. Piezo-power microdissection of mature human dental tissue. *Arch Oral Biol.* 48(10):731-6.
- Min KS, Lee HJ, Kim SH, Lee SK, Kim HR, Pae HO, Chung HT, Shin HI, Lee SK, Kim EC. 2008. Hydrogen peroxide induces heme oxygenase-1 and dentin sialophosphoprotein mRNA in human pulp cells. *J Endod.* 34(8):983-9. Epub 2008 Jun 20.
- Montero C. 2003. The antigen-antibody reaction in immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem.* 51(1):1-4.
- Mooradian BA, Cutler LS. 1978. Developmental distribution of microperoxisomes in the rat submandibular gland. *J Histochem Cytochem.* 26(11):989-99.
- Nanci A, Bendayan M, Slavkin HC. 1985. Enamel protein biosynthesis and secretion in mouse incisor secretory ameloblasts as revealed by high-resolution immunocytochemistry. *J Histochem Cytochem.* 33(11):1153-60.
- Nenicu A, Luers GH, Kovacs W, David M, Zimmer A, Bergmann M, Baumgart-Vogt E. 2007. Peroxisomes in human and mouse testis: differential expression of peroxisomal proteins in germ cells and distinct somatic cell types of the testis. *Biol Reprod.* 77(6):1060-72. Epub 2007 Sep 19.
- Nirenberg MW, Matthaei JH. 1961. The dependence of cell-free protein synthesis in *E. coli* upon naturally occurring or synthetic polyribonucleotides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 47:1588-602.
- Noda M, Wataha JC, Lewis JB, Kaga M, Lockwood PE, Messer RL, Sano H. 2005. Dental adhesive compounds alter glutathione levels but not glutathione redox balance in human THP-1 monocytic cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 73(2):308-14.
- Nomura S, Takemori N. 1960. Mutation of polioviruses with respect to size of plaque. I. Selection of minute plaque mutants of three types of polioviruses in tissue cultures. *Virology.* 12:154-70.

- Obert M, Ahlemeyer B, Baumgart-Vogt E, Traupe H. 2005. Flat-panel volumetric computed tomography: a new method for visualizing fine bone detail in living mice. *J Comput Assist Tomogr.* 29(4):560-5.
- Otsuji W, Tanase S, Yoshida S, Bawden JW. 1999. The immunohistochemical localization of the interferon-gamma and granulocyte colony-stimulating factor receptors during early amelogenesis in rat molars. *Arch Oral Biol.* 44(2):173-81.
- Platta HW, Erdmann R. 2007. Peroxisomal dynamics. *Trends Cell Biol.* 17(10):474-84.
- Poll-The BT, Gootjes J, Duran M, De Klerk JB, Wenniger-Prick LJ, Admiraal RJ, Waterham HR, Wanders RJ, Barth PG. 2004. Peroxisome biogenesis disorders with prolonged survival: phenotypic expression in a cohort of 31 patients. *Am J Med Genet A.* 126A(4):333-8.
- Provenza DV. 1988. *Fundamentals of Oral Histology and Embryology* Philadelphia: Lea & Febiger.
- Ravindranath RM, Basilrose RM, Sr., Ravindranath NH, Vaitheesvaran B. 2003. Amelogenin interacts with cytokeratin-5 in ameloblasts during enamel growth. *J Biol Chem.* 278(22):20293-302. Epub 2003 Mar 25.
- Ravindranath RM, Tam WY, Bringas P, Jr., Santos V, Fincham AG. 2001. Amelogenin-cytokeratin 14 interaction in ameloblasts during enamel formation. *J Biol Chem.* 276(39):36586-97. Epub 2001 Jun 25.
- Raychaudhury B, Gupta S, Banerjee S, Datta SC. 2006. Peroxisome is a reservoir of intracellular calcium. *Biochim Biophys Acta.* 1760(7):989-92. Epub 2006 Mar 31.
- Reddy JK. 2004. Peroxisome proliferators and peroxisome proliferator-activated receptor alpha: biotic and xenobiotic sensing. *Am J Pathol* 164(6):2305-21.
- Rhodin J. 1955. Electron microscopy of the glomerular capillary wall. *Exp Cell Res.* 8(3):572-4.
- Robinson C, Briggs HD, Atkinson PJ. 1981. Histology of enamel organ and chemical composition of adjacent enamel in rat incisors. *Calcif Tissue Int.* 33(5):513-20.
- Roels F, Espeel M, Pauwels M, De Craemer D, Egberts HJ, van der Spek P. 1991. Different types of peroxisomes in human duodenal epithelium. *Gut.* 32(8):858-65.
- Romeis B. 1989. 1989. München, Wien, Baltimore: Urban & Schwarzenberg.
- Sacksteder KA, Gould SJ. 2000. The genetics of peroxisome biogenesis. *Annu Rev Genet.* 34:623-652.
- Sasaki T, Garant PR. 1986. Ultracytochemical demonstration of ATP-dependent calcium pump in ameloblasts of rat incisor enamel organ. *Calcif Tissue Int.* 39(2):86-96.
- Sasaki T, Garant PR. 1996. Structure and organization of odontoblasts. *Anat Rec.* 245(2):235-49.
- Sasaki T, Takagi M, Yanagisawa T. 1997. Structure and function of secretory ameloblasts in enamel formation. *Ciba Found Symp.* 205:32-46; discussion 46-50.

- Sasano H, Nagasaki S, Miki Y, Suzuki T. 2009. New developments in intracrinology of human breast cancer: estrogen sulfatase and sulfotransferase. *Ann N Y Acad Sci.* 1155:76-9.
- Schad CR, Hanson CA, Paietta E, Casper J, Jalal SM, Dewald GW. 1994. Efficacy of fluorescence in situ hybridization for detecting PML/RARA gene fusion in treated and untreated acute promyelocytic leukemia. *Mayo Clin Proc.* 69(11):1047-53.
- Schell-Steven A, Stein K, Amoros M, Landgraf C, Volkmer-Engert R, Rottensteiner H, Erdmann R. 2005. Identification of a novel, intraperoxisomal pex14-binding site in pex13: association of pex13 with the docking complex is essential for peroxisomal matrix protein import. *Mol Cell Biol* 25(8):3007-18.
- Schemenewitz A. 2003. Untersuchungen zur Funktion der Peroxine Pex17p und Pex13p im peroxisomalen Matrixproteinimport der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Bochum.
- Schrader M, Fahimi HD. 2006a. Growth and division of peroxisomes. *Int Rev Cytol.* 255:237-90.
- Schrader M, Fahimi HD. 2006b. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta.* 1763(12):1755-66. Epub 2006 Sep 14.
- Schrader M, Wodopia R, Fahimi HD. 1999. Induction of tubular peroxisomes by UV irradiation and reactive oxygen species in HepG2 cells. *J Histochem Cytochem.* 47(9):1141-8.
- Schroeder HE. 2000. *Orale Strukturbilogie*. Stuttgart: Thieme Verlag.
- Schroll I. 2004. *Genexpression während der Zahnentwicklung der Maus (Mus musculus)*. München.
- Schwarz KB, Cox JM, Sharma S, Clement L, Humphrey J, Gleason C, Abbey H, Sehnert SS, Risby TH. 1997. Possible antioxidant effect of vitamin A supplementation in premature infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 25(4):408-14.
- Seedorf U, Ellinghaus P, Roch Nofer J. 2000. Sterol carrier protein-2. *Biochim Biophys Acta* 1486(1):45-54.
- Shimozawa N. 2007. Molecular and clinical aspects of peroxisomal diseases. *J Inherit Metab Dis.* 30(2):193-7. Epub 2007 Mar 8.
- Slavkin HC, Mino W, Bringas P, Jr. 1976. The biosynthesis and secretion of precursor enamel protein by ameloblasts as visualized by autoradiography after tryptophan administration. *Anat Rec.* 185(3):289-312.
- Smith CE, Warshawsky H. 1977. Multinucleate ameloblasts in the rat incisor. *Anat Rec.* 188(4):407-15.
- Sosenko IR. 1995. Do polyunsaturated fatty acids protect against oxidant-induced lung damage? *J Nutr.* 125(6 Suppl):1652S-1656S.
- South ST, Baumgart E, Gould SJ. 2001. Inactivation of the endoplasmic reticulum protein translocation factor, Sec61p, or its homolog, Ssh1p, does not affect peroxisome biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(21):12027-31. Epub 2001 Oct 2.

- Spagnuolo G, Annunziata M, Rengo S. 2004. Cytotoxicity and oxidative stress caused by dental adhesive systems cured with halogen and LED lights. *Clin Oral Investig.* 8(2):81-5. Epub 2003 Dec 16.
- Stier H, Fahimi HD, Van Veldhoven PP, Mannaerts GP, Volkl A, Baumgart E. 1998. Maturation of peroxisomes in differentiating human hepatoblastoma cells (HepG2): possible involvement of the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPAR alpha). *Differentiation.* 64(1):55-66.
- Subramani S. 2002. Hitchhiking fads en route to peroxisomes. *J Cell Biol.* 156(3):415-7. Epub 2002 Feb 4.
- Swinkels BW, Gould SJ, Subramani S. 1992. Targeting efficiencies of various permutations of the consensus C-terminal tripeptide peroxisomal targeting signal. *FEBS Lett.* 305(2):133-6.
- Tabata MJ, Matsumura T, Liu JG, Wakisaka S, Kurisu K. 1996. Expression of cytokeratin 14 in ameloblast-lineage cells of the developing tooth of rat, both in vivo and in vitro. *Arch Oral Biol.* 41(11):1019-27.
- ten Cate JM. 1994. In situ models, physico-chemical aspects. *Adv Dent Res.* 8(2):125-33.
- Thesleff I, Aberg T. 1999. Molecular regulation of tooth development. *Bone.* 25(1):123-5.
- Thesleff I, Nieminen P. 1996. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 8(6):844-50.
- Thesleff I, Sharpe P. 1997. Signalling networks regulating dental development. *Mech Dev.* 67(2):111-23.
- Thesleff I, Stenman S, Vaheri A, Timpl R. 1979. Changes in the matrix proteins, fibronectin and collagen, during differentiation of mouse tooth germ. *Dev Biol.* 70(1):116-26.
- Thoms S, Erdmann R. 2005. Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *Febs J.* 272(20):5169-81.
- Torres-Quintana MA, Gaete M, Hernandez M, Farias M, Lobos N. 2005. Ameloblastin and amelogenin expression in posnatal developing mouse molars. *J Oral Sci.* 47(1):27-34.
- Tsuchiya M, Sasano Y, Kagayama M, Watanabe M. 2002. The extent of odontoblast processes in the dentin is distinct between cusp and cervical regions during development and aging. *Arch Histol Cytol.* 65(2):179-88.
- Tsukamoto T, Miura S, Fujiki Y. 1991. Restoration by a 35K membrane protein of peroxisome assembly in a peroxisome-deficient mammalian cell mutant. *Nature.* 350(6313):77-81.
- Van Dijck PW, De Kruijff B, Van Deenen LL, De Gier J, Demel RA. 1976. The preference of cholesterol for phosphatidylcholine in mixed phosphatidylcholine-phosphatidylethanolamine bilayers. *Biochim Biophys Acta.* 455(2):576-87.
- Volkin E, Astrachan L, Countryman JL. 1958. Metabolism of RNA phosphorus in *Escherichia coli* infected with bacteriophage T7. *Virology.* 6(2):545-55.



- Völkl A, Mohr H, Weber G, Fahimi HD. 1998. Isolation of peroxisome subpopulations from rat liver by means of immune free-flow electrophoresis. *Electrophoresis*. 19(7):1140-4.
- Wanders RJ, Kos M, Roest B, Meijer AJ, Schrakamp G, Heymans HS, Tegelaers WH, van den Bosch H, Schutgens RB, Tager JM. 1984. Activity of peroxisomal enzymes and intracellular distribution of catalase in Zellweger syndrome. *Biochem Biophys Res Commun*. 123(3):1054-61.
- Wanders RJ, Schutgens RB, Tager JM. 1985. Peroxisomal matrix enzymes in Zellweger syndrome: activity and subcellular localization in liver. *J Inher Metab Dis*. 8(Suppl 2):151-2.
- Wanders RJ, Waterham HR. 2006. Peroxisomal disorders: the single peroxisomal enzyme deficiencies. *Biochim Biophys Acta*. 1763(12):1707-20. Epub 2006 Aug 23.
- Welsch U. 2003. Sobotta Lehrbuch Histologie. München-Jena: Urban & Fischer.
- Werner M, Von Wasielewski R, Komminoth P. 1996. Antigen retrieval, signal amplification and intensification in immunohistochemistry. *Histochem Cell Biol*. 105(4):253-60.
- White JA, McAlpine PJ, Antonarakis S, Cann H, Eppig JT, Frazer K, Frezal J, Lancet D, Nahmias J, Pearson P and others. 1997. Guidelines for human gene nomenclature (1997). HUGO Nomenclature Committee. *Genomics*. 45(2):468-71.
- Wiemer EA, Wenzel T, Deerinck TJ, Ellisman MH, Subramani S. 1997. Visualization of the peroxisomal compartment in living mammalian cells: dynamic behavior and association with microtubules. *J Cell Biol*. 136(1):71-80.
- Wise GE, Frazier-Bowers S, D'Souza RN. 2002. Cellular, molecular, and genetic determinants of tooth eruption. *Crit Rev Oral Biol Med* 13(4):323-34.
- Yamamoto T, Oida S, Inage T. 2006. Gene expression and localization of insulin-like growth factors and their receptors throughout amelogenesis in rat incisors. *J Histochem Cytochem*. 54(2):243-52. Epub 2005 Oct 31.
- Yokota S, Fahimi HD. 2009. Degradation of excess peroxisomes in mammalian liver cells by autophagy and other mechanisms. *Histochem Cell Biol*. 131(4):455-8. Epub 2009 Feb 20.
- Young WG. 1995. Growth hormone and insulin-like growth factor-I in odontogenesis. *Int J Dev Biol*. 39(1):263-72.
- Zeichner-David M, Oishi K, Su Z, Zakartchenko V, Chen LS, Arzate H, Bringas P, Jr. 2003. Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev Dyn*. 228(4):651-63.
- Zeichner-David M, Vo H, Tan H, Diekwisch T, Berman B, Thiemann F, Alcocer MD, Hsu P, Wang T, Eyna J and others. 1997. Timing of the expression of enamel gene products during mouse tooth development. *Int J Dev Biol*. 41(1):27-38.
- Zoeller RA, Lake AC, Nagan N, Gaposchkin DP, Legner MA, Lieberthal W. 1999. Plasmalogens as endogenous antioxidants: somatic cell mutants reveal the importance of the vinyl ether. *Biochem J*. 338(Pt 3):769-76.

## **9. Eigene Veröffentlichung**

**Teile dieser Arbeit wurden beim *Annual Meeting of the German Society for Cell Biology 2007, Frankfurt (Germany)* als Poster vorgestellt und unter folgendem Titel veröffentlicht:**

**Weßel, I., Baumgart-Vogt, E. (2007).** "Alterations of the peroxisomal compartment during the development of dental and paradental structures – Heterogeneity of peroxisomal enzyme content in ameloblasts and odontoblasts." *Eur J Cell Biol.* 86 (Suppl. 57): 53, Abstract O-35.

## **10. Erklärung**

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die ich wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen habe, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

## **11. Danksagung**

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. med. E. Baumgart-Vogt, dass sie mir die Forschungsarbeit zu diesem Thema ermöglicht hat, immer tolle Ideen hatte und mit Ihrem Wissen bei praktischen und theoretischen Fragen stets zur Seite stand.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern im Institut, die mir bei meiner Arbeit mit Rat und Tat zur Seite standen, die mich in die labortechnischen Methoden eingearbeitet oder Mäuse gezüchtet haben. Außerdem danke ich für die netten Kaffeerunden und die tollen Betriebsausflüge. Es war eine schöne Zeit!

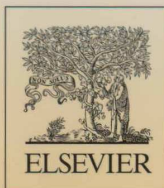
Der nächste große Dank gilt meinen Eltern, die mich während dieser Zeit unterstützt haben. Natürlich danke ich auch meiner Schwester, die sich am Telefon immer brav nach dem Fortschritt der Disseration erkundigte. Und nicht zuletzt Jürgen, der an so manchem Tag auf mich verzichten musste.

**Danke!**

Freudenberg, November 2009

**Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen  
Version der Arbeit entfernt.**

**The curriculum vitae was removed from the  
electronic version of the paper.**



# EJCB

European Journal of Cell Biology

## Abstracts

Volume 86S1 · Suppl. 57  
March 2007  
ISSN 0171-9335



German Society for Cell Biology

Annual  
Meeting  
**2007**

March 14 to March 17

Frankfurt/Main  
Germany



overall structure of the (D74K) mutant is very similar to the native one. Even though the salt bridge is corrupted by point mutation, the N-domain of MmCen1-L unexpectedly keeps the closed form. The transducin binding of the (D74K) mutant shows higher signal amplitudes in the light scattering assay than binding of the native centrin 1. This study demonstrates detailed structural aspects of the (D74K) mutant and that transducin-centrin interaction is affected by this mutation.

Supports: DFG

[alexander.pulvermueller@charite.de](mailto:alexander.pulvermueller@charite.de)

### O-35

#### **Alteration of the peroxisomal compartment during development of dental and parodontal tissues – Heterogeneity of peroxisomal enzyme content in ameloblasts and odontoblasts**

[Weßel I.<sup>1</sup>](#), Baumgart-Vogt E.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Justus Liebig University, Department of Anatomy and Cell Biology II, Gießen, Germany*

Patients with mild forms of peroxisomal biogenesis disorders show facial dysmorphism and exhibit dentition problems accompanied by enamel hypoplasia. However, no information is available on the role of peroxisomes in dental and parodontal tissues. Therefore, we studied the distribution of these organelles, their protein composition and the expression of corresponding genes during dental development and in mature decalcified teeth in mice. Perfusion-fixed heads of mice of different developmental stages (E13.5 to adult) were cut in sagittal direction into two halves and embedded in Paraffin for serial sectioning and subsequent double-immunofluorescence preparations. Unfixed heads of newborn mice were frozen in liquid nitrogen and cryosections used for laser-assisted microdissection of ameloblasts and odontoblasts, RNA isolation and RT-PCR analysis. Our results revealed the presence of peroxisomes already in the bud stage of dental development. An increase of peroxisome abundance was noted during differentiation of ameloblasts and odontoblasts with the highest number of these organelles in Tomes processes of mature ameloblasts. A strong heterogeneity of peroxisomal enzyme content developed within distinct dental cell types. A drastic down-regulation of catalase in maturing ameloblasts was noted in contrast to high levels of lipid metabolizing enzymes in peroxisomes of these cells.

[eveline.baumgart-vogt@anatomie.med.uni-giessen.de](mailto:eveline.baumgart-vogt@anatomie.med.uni-giessen.de)

### O-36

#### **Downregulation of centrin 2 via RNA interference in mammalian cells**

[Krokozinski S.<sup>1</sup>](#), Gießl A.<sup>1</sup>, Wolfrum U.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Institute for Zoology, Johannes Gutenberg-Universität, Mainz, Germany*

Centrins are members of a highly conserved subgroup of the EF-hand superfamily of Ca<sup>2+</sup>-binding proteins commonly associated with centrosome-related structures. Centrosomes are the main microtubule organizing centers in eucaryotic cells and are composed of two centrioles which are embedded in the pericentriolar material. During the cell cycle the centrosome and centrioles duplicate before the cell can divide properly. Centrin 2 is located in the inner lumen of centrioles and is assumed to be involved in centriole duplication. In the present study, centrin 2 was knocked down in human HeLa-cells and murine NIH3T3 cells via RNA interference (RNAi). These human centrin 2-specific RNAi-analyses with HeLa-cells revealed multinuclear cells and cells with an aberrant number of spindle poles. Our data confirm previous results obtained in human HeLa cells (Salisbury et al. 2002, Curr.Biol:12:1287). The application of murine centrin 2 specific short interfering RNA to murine NIH3T3 also induced aberrant numbers of centrioles, but did not cause an increase of nuclei in the cells. These analyses indicate that centrin 2 is essential for the centriole duplication and the correct division of mammalian cells in general.

Support: FAUN, DFG

[s.krokozinski@web.de](mailto:s.krokozinski@web.de)



